

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Juli 2004 (29.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/063366 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00, 9/02, C12P 23/00, C12N 5/04

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/014876

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Dezember 2003 (24.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 00 649.4 9. Januar 2003 (09.01.2003) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): STEIGER, Sabine [DE/DE]; Händelstr. 5, 64291 Darmstadt (DE). SANDMANN, Gerhard [DE/DE]; Goldackerweg 12B, 61440 Oberursel (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING KETOCAROTENOIDS BY CULTIVATING GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KETOCAROTINOÏDEN DURCH KULTIVIERUNG VON GENETISCH VERÄNDERTEN ORGANISMEN

NUCLEOTIDE SEQUENCE ORF 38 (786 bp)

Nukleotidsequenz ORF 38 (786 bp)

```
TTGAATTTGTGATAAACCGAGTAGCTATTATGGTCAATAGAGCAATTAGTGCTAAAGAAGATACTGTTGGGGCTGGTATTGTCTAGTAAATTAGTCCTGGGTAGC-TAGTTGGCTTTTACTAGCTATAATTATGCCAAAGTCCCAATTGGTTGATACCTATTG-CAATAGTTGGCAAATGTTCTTATACAGGGTATTACTGCACATGATGCTATG-CATGGGTCACTTATCGAAAAATCCAAAATTATAATTATTCGGTTCACTAGCTG-TAGCGCTTACCGCTGTTCCATATCACAGATGTTAAAGAACTTGTCTTACAT-CATCGTCATCCTGCTAGCGAAGTTGACCCAGATTTCATGATGTTAGAGAGAACAAACGC-TATTTCTGGTATCTCCATTCTGATGATAAATCTCCAGTTGGCACAGTAAATAGTAC-TAACTATCCTATTAATTAGCTAAATACGTTGCACATCCATCCAAATAAAATCTCATCT-TATTTGGAGATTCTCCAATTAAAGTTCATTCAACTGTTTATTCGGAA-CATTTCGCCTCATCGAGAACCCAAGAAAGGATATGTTATCCCATTGCGACCAAACAA-TAAAATTGCCAACTTTGTCAATTATCGCTTGCTACCACTTTGGTTATCATGAGAACAT-CATGAGTATCCCCATGTACCTTGGCAACTTCCATCTGTATATAAGCAGAGAGTATT-CAACAATTCACTGAAACCAATTCTGAA
```

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing ketocarotenoids by cultivating genetically modified organisms that have a modified ketolase activity in relation to the wild type. The invention also relates to said genetically modified organisms, and to the use of the same as foodstuff and animal feed and for the production of ketocarotenoid extracts.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoïden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

NUCLEOTIDE SEQUENCE ORF 148 (759 bp)

Nukleotidsequenz ORF 148 (759 bp)

```
GTGATCCAGTTAGAACACCACTCAGTCATCAAGCAAAAGTGAACCCAGTACTGAGAAGTAATCTCAGTTAACGGGCTTTCTGCTATTGCTATTGTTAGCGCATGGCTCATTAGCCTGAGTTTATTACTTCCCTGATGACATCTCAAAGCTAAAATTGGATGTTATGGCTGTTATACTA-TGGCAAACATTTTATATACGGGATTATTATTACATCTCATGATGCCATGCATGGCGTAG-TATTCCTTACACCAAGGATTAATCATTTGATTGGAACATTGACCCCTATCCCT-TATGGTCTTACCATATCAAAACTATTGAAAAAACATTGGTACACCACCAATCCAG-CAAGCTCAATAGACCCGGATTTACAATGGTAAACACCAAAGTTTCTTGCTTGG-TATTTCTGTTATGAAAGGTTACTGGAGTTGGGGCAAATAATTGCGTTGACTATTATT-TATAACTTGTCTAAATACATCTCATCCAAAGTGTATACTCTAATTGTTGACTTTGGTGC-TACCCCTCGCTTAAAGTTCATTACAATTCTATTGTTACTTTACCCATAGT-GAACCAATAGGGGTTATGTCAGCCTCATGGCCCAAACAAATTAGCCGTC-C-TATTTGGTGTCTTATCAGCTGCTATCATTTGGCTACCCACGAGGAACATCACGAA-TATCCTCATATTCTGGTGGCAGTTACCAAGAAATTACAAGCAAATAG
```

WO 2004/063366 A1



PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO Patent (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Organismen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Ketocarotinoidextrakten.

10

Ketocarotinoide treten hauptsächlich bei Bakterien, wenigen Pilzen und als Sekundärcarotinoide bei Grünalgen auf. Neben Echinenon, dem 4-Monoketo Derivat des β -Carotins wird auch die entsprechende symmetrische Diketo Verbindung Canthaxanthin gebildet. Daneben sind von den o.g. Organismengruppen einige wenige Spezies bekannt, in denen Astaxanthin (= 3,3'-Hydroxy-15 4,4'-keto- β -carotin) als Endprodukt der Biosynthese (zusammen mit geringen Mengen entsprechender Intermediate) zu finden ist (Goodwin, T.W. (1980) The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. 1: Plants, 2nd edn. Chapman & Hall, New York.; Johnson, E.A. & An G.-H. (1991) Astaxanthin from microbial sources. Critical Rev. Biotechnol. 11, 297-326.; 3. Lorenz, R.T. & Cysewski, G.R. (2000) Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source 20 of astaxanthin. Trend Biotechn. 18, 160-167).

Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

25

Die Herstellung von Astaxanthin erfolgt heutzutage größtenteils durch chemische Syntheseverfahren. Natürliche Ketocarotinoide, wie beispielsweise natürliches Astaxanthin, werden heutzutage in biotechnologischen Verfahren in kleinen Mengen durch Kultivierung von Algen, beispielsweise *Haematococcus pluvialis* oder durch Fermentation von gentechnologisch optimierten Mikroorganismen und anschließender Isolierung gewonnen.

Ein wirtschaftliches biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Ketocarotinoiden ist daher von großer Bedeutung.

35

Spezifische Ketolase Gene des *crtW* Typs wurden aus den Bakterien *Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), *Paracoccus marcusii* (Accession NO: Y15112) und als cDNA aus *Haematococcus* (*Haematococcus pluvialis* Flotow em. Wille und *Haematococcus pluvialis*, NIES-144 (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881)) kloniert und funktionell identifiziert.

40

Daneben existieren noch ORFs aus anderen Organismen, die auf Grund von Aminosäure Homologien als Ketolase Gene bezeichnet werden, wie beispielsweise Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase aus aus *Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422), *Synechocystis sp. Strain PC6803* (Accession NO: NP_442491), *Bradyrhizobium sp.* (Accession NO: AF218415), *Nostoc sp. PCC 7120* (Kaneko et al, DNA Res. 2001, 8(5), 205 - 213; Accession NO: AP003592, BAB74888) und *Brevundimonas aurantiaca* (WO 02079395).

Biochemisch sind lediglich die Ketolase aus *A. aurantiacum* und *Alcaligenes spec.* charakterisiert worden (Fraser P.D., Shimada H. & Misawa N.(1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. Eur. J. Biochem. 252, 229-236.). Es gibt noch einen weiteren Typ von β -Carotin Ketolase Genen, *crtO* aus dem Cyanobacterium *Synechocystis*, das keine Ähnlichkeit mit *crtW* aufweist und mit den bakteriellen Desaturasen verwandt ist (Fernandez-Gonzalez, B., Sandmann, G. & Vioque, A (1997) A new type of asymmetrically acting β -carotene ketolase is required for the synthesis of echinenone in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J. Biol. Chem. 272, 9728-9733.)

Alle bekannten Ketolasen können bei β -Carotin in Position 4 eine Ketogruppe einfügen. Das *crtO* Gen kodiert für eine Monoketolase, die Echinenon als Endprodukt aus β -Carotin bildet. Die *crtW* Genfamilie, zu der auch *bkt* aus *Haematococcus* gehört, kodiert für eine Diketolase, die β -Carotin bis zu Canthaxanthin umsetzt. Diese Reaktion scheint der erste Modifikationsschritt in Richtung Astaxanthin zu sein, dem sich eine Hydroxylierung an Position 3 anschließt. Die gleiche Reaktionssequenz gilt dann auch für den zweiten Ionen Ring (9). Es gibt auch enzymatische Hinweise, dass 3-Hydroxy- β -carotin Derivate nur schlecht an Position 4 ketoliert werden können. Es hat sich ebenfalls gezeigt, dass nur bestimmte bakterielle Hydroxylasen, wie die von *Erwinia uredovora* (Breitenbach, J., Misawa, N., Kajiwara, S. & Sandmann, G. (1996) Expression in *Escherichia coli* and properties of the carotene ketolase from *Haematococcus pluvialis*. FEMS Microbiol. Lett. 140, 241-246) oder *A. aurantiacum* in der Lage sind ketolierte Intermediate umzusetzen. Die strukturell unterschiedlichen Hydroxylasen der Cyanobakterien können dies nicht (Albrecht, M., Steiger, S. & Sandmann, G. (2001) Expression of a ketolase gene mediates the synthesis of canthaxanthin in *Synechococcus* leading to resistance against pigment photodegradation and UV-B sensitivity of photosynthesis. Photochem. Photobiol. 73, 551-555.). Es erfolgt keine Kooperation dieses Typs von Hydroxylase mit einer Ketolase, und man erhält keine substantiellen Mengen an Astaxanthin.

EP 735 137 beschreibt die Herstellung von Xanthophyllen in Mikroorganismen, wie beispielsweise *E. coli* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtW*) aus *Agrobacterium aurantiacum* oder *Alcaligenes sp. PC-1* in Mikroorganismen.

Aus EP 725 137, WO 98/18910, Kajiwara et al. (Plant Mol. Biol. 1995, 29, 343-352) und Hirschberg et al.(FEBS Letters 1995, 364, 125-128) ist es bekannt, Astaxanthin durch Einbringen von Ketolase-Genen aus *Haematococcus pluvialis* (*crtW*, *crtO* oder *bkt*) in *E. coli* herzustellen.

5 Hirschberg et al.(FEBS Letters 1997, 404, 129-134) beschreiben die Herstellung von Astaxanthin in *Synechococcus* durch Einbringen von Ketolase-Genen (*crtO*) aus *Haematococcus pluvialis*. Sandmann et al. (Photochemistry and Photobiology 2001, 73(5), 551-55) beschreiben ein analoges Verfahren, das jedoch zur Herstellung von Canthaxanthin führt und nur Spuren Astaxanthin liefert.

10 WO 98/18910 und Hirschberg et al. (Nature Biotechnology 2000, 18(8), 888-892) beschreiben die Synthese von Ketocarotinoiden in Nektarien von Tabakblüten durch Einbringen des Ketolase-Gens aus *Haematococcus pluvialis* (*crtO*) in Tabak.

15 WO 01/20011 beschreibt ein DNA Konstrukt zur Produktion von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin, in Samen von Ölsaatpflanzen wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne und Senf unter Verwendung eines Samen-spezifischen Promoters und einer Ketolase aus *Haematococcus pluvialis*.

20 Alle im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden und insbesondere die beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Astaxanthin weisen den Nachteil auf, daß die transgenen Organismen nur geringe Mengen an Astaxanthin liefern.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere genetisch veränderte Organismen, die Ketocarotinoide herstellen, zur Verfügung zu stellen, die die vorstehend beschriebenen Nachteile des Standes der Technik in geringerem Maße oder nicht mehr aufweisen.

30 Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden gefunden, indem man genetisch veränderte Organismen kultiviert, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die erfindungsgemäßen Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen sind vorzugsweise als Ausgangsorganismen natürlicherweise in der Lage, Carotinoide wie beispielsweise β-Carotin oder Zeaxanthin herzustellen, oder können durch genetische Veränderung, wie

beispielsweise Umregulierung von Stoffwechselwegen oder Komplementierung in die Lage ver-
setzt werden, Carotinoide wie beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin herzustellen.

Einige Organismen sind als Ausgangs- oder Wildtyporganismen bereits in der Lage, Ketocaroti-
noide wie beispielsweise Astaxanthin oder Canthaxanthin herzustellen. Diese Organismen, wie
beispielsweise *Haematococcus pluvialis*, *Paracoccus marcusii*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Bacillus circulans*, *Chlorococcum*, *Phaffia rhodozyma*, *Adonis sp.*, *Neochloris wimmeri*, *Protosiphon botryoides*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Scenedesmus vacuolatus*, *Chlorella zofingiensis*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena sanguinea*, *Bacillus atrophaeus*, *Blakeslea we-
isen* bereits als Ausgangs- oder Wildtyporganismus eine Ketolase-Aktivität auf.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher als Ausgangsor-
ganismen Organismen verwendet, die bereits als Wildtyp oder Ausgangsorganismus eine Keto-
laseaktivität aufweisen. In dieser Ausführungsform bewirkt die genetische Veränderung eine
Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp oder Ausgangsorganismus.

Unter Ketolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Ketolase verstanden.

Unter einer Ketolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am,
gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Keto-Gruppe einzuführen.

Insbesondere wird unter einer Ketolase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität
aufweist, β -Carotin in Canthaxanthin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Ketolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein
Ketolase umgesetzte Menge β -Carotin bzw. gebildete Menge Canthaxanthin verstanden.

Bei einer erhöhten Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wild-
typ in einer bestimmten Zeit durch das Protein Ketolase die umgesetzte Menge β -Carotin bzw.
die gebildete Menge Canthaxanthin erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Ketolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt
mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, be-
vorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens
600 % der Ketolase-Aktivität des Wildtyps.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsorganismus
verstanden.

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Organismus" der Ausgangsorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Organismus oder beides verstanden werden.

5

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität, für die nachstehend beschriebene Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an

10 Ketocarotinoiden jeweils ein Referenzorganismus verstanden.

Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Haematococcus pluvialis*.

15 Dieser Referenzorganismus ist für Mikroorganismen, die als Wildtyp keine Ketolase Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Blakeslea*.

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die bereits als Wildtyp eine Ketolase-Aktivität aufweisen, vorzugsweise *Adonis aestivalis*, *Adonis flammeus* oder *Adonis annuus*, besonders bevorzugt *Adonis aestivalis*.

Dieser Referenzorganismus ist für Pflanzen, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität in Blütenblätter aufweisen, vorzugsweise *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

30

Die Bestimmung der Ketolase-Aktivität in Pflanzen- oder Mikroorganismenmaterial erfolgt in Anlehnung an die Methode von Frazer et al., (J. Biol. Chem. 272(10): 6128-6135, 1997). Die Ketolase-Aktivität in pflanzlichen oder Mikroorganismus-Extrakten wird mit den Substraten β -Carotin und Canthaxanthin in Gegenwart von Lipid (Sojalecithin) und Detergens (Natriumcholat) bestimmt. Substrat/Produkt-Verhältnisse aus den Ketolase-Assays werden mittels HPLC ermittelt.

Die Erhöhung der Ketolase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Protein-

ebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Ketolase–Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in den Organismus.

5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, wird erfindungsgemäß in dieser Ausführungsform auch die Manipulation der Expression der Organismen eigenen endogenen Ketolasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Ketolase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Ketolase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

10

Es ist wie vorstehend beschrieben möglich, die Expression mindestens einer endogenen Ketolase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

15 Des weiteren kann eine erhöhte Expression mindestens eines endogenen Ketolase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im Wildtyporganismus nicht vorkommendes oder modifiziertes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

20 Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

25 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ketolase–Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

30 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, in die Organismen, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

35

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Ketolase–Gen vor, kodierend eine Ketolase, ent-

haltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 In dieser Ausführungsform weist der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus dementsprechend mindestens eine exogene (=heterologe) Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, auf oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, auf, wobei die Ketolasen die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 10

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangsorganismen Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolaseaktivität aufweisen.

- 15 In dieser bevorzugten Ausführungsform verursacht die genetische Veränderung die Ketolase-Aktivität in den Organismen. Der erfindungsgemäße genetisch veränderte Organismus weist somit in dieser bevorzugten Ausführungsform im Vergleich zum genetisch nicht veränderten Wildtyp eine Ketolase-Aktivität auf und ist somit vorzugsweise in der Lage, transgen eine Ketolase zu exprimieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
- 20

In dieser bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, analog zu der vorstehend beschriebenen Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, vorzugsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, in den Ausgangsorganismus.

- 30
- 35 Dazu kann in beiden Ausführungsformen prinzipiell jede Nukleinsäure, die eine Ketolase kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, verwendet werden.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, führt im erfindungsgemäßen Verfahren überraschenderweise zu einer höheren Ausbeute an Ketocaroti-

noiden, insbesondere an Astaxanthin als bei der Verwendung der im Stand der Technik verwen-
deten Ketolase-Gene.

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA-
5 oder cDNA-Sequenz sein.

Bei genomischen Ketolase-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind
für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt wer-
den kann, die entsprechenden Ketolase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nuklein-
10 säuresequenzen wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, und die entsprechenden Ketolasen, ent-
haltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substituti-
on, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindes-
15 tens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, die im erfindungs-
gemäßem Verfahren vorteilhaft verwendet werden können, sind beispielsweise Sequenzen aus

Nostoc punctiforme PCC73102 ORF 38, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000195, Basen-
paar 55,604 bis 55,392 (SEQ ID NO: 1); Protein: Acc.-No. ZP_00111258 (SEQ ID NO: 2) (als
20 putatives Protein annotiert) oder

Nostoc punctiforme PCC73102 ORF 148, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basen-
paar 140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 3), Protein: (SEQ ID NO: 4) (nicht annotiert)

25 oder von diesen Sequenzen abgeleitete Ketolasesequenzen.

Abbildung 1 zeigt zusätzlich die Nukleinsäuresequenzen von ORF 38 und ORF 148 aus *Nostoc
punctiforme*.

30 Für die Herstellung von Astaxanthin ist insbesondere die Verwendung der Ketolase *Nostoc
punctiforme PCC73102* ORF 148, Nukleinsäure: Acc.-No. NZ_AABC01000196, Basenpaar
140,571 bis 139,810 (SEQ ID NO: 3), Protein: (SEQ ID NO: 4) oder von dieser Sequenz abgeleit-
ete Sequenzen besonders bevorzugt.

35 Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene, die im erfindungsgemäßem Ver-
fahren verwendet werden können, lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen,
deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Aminosäuresequenzen
oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit den
vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 leicht auffinden.

Weitere natürliche Beispiele für Ketolasen und Ketolase-Gene lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von den Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Die Hybridisierung kann unter moderaten (geringe Stringenz) oder vorzugsweise unter stringenten (hohe Stringenz) Bedingungen erfolgen.

10

Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben.

15

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 2X SSC bei 50_C) und solchen mit hoher Stringenz (mit 0.2X SSC bei 50_C, bevorzugt bei 65_C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid, pH 7.0).

20

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von moderaten Bedingungen bei Raumtemperatur, 22°C, bis zu stringenten Bedingungen bei 65°C angehoben werden.

Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch 25 kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

30 Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschritt sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

(i) 4X SSC bei 65°C, oder

35

(ii) 6X SSC bei 45°C, oder

(iii) 6X SSC bei 68°C, 100 mg/ml denaturierter Fischsperma-DNA, oder

(iv) 6X SSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 68°C, oder

5 (v) 6XSSC, 0.5 % SDS, 100 mg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(vi) 50 % Formamid, 4X SSC bei 42°C, oder

10 (vii) 50 % (vol/vol) Formamid, 0.1 % Rinderserumalbumin, 0.1 % Ficoll, 0.1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C, oder

(viii) 2X oder 4X SSC bei 50°C (moderate Bedingungen), oder

15 (ix) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42° (moderate Bedingungen).

(2) Waschschritte für jeweils 10 Minuten mit zum Beispiel

(i) 0.015 M NaCl/0.0015 M Natriumcitrat/0.1 % SDS bei 50°C, oder

20 (ii) 0.1X SSC bei 65°C, oder

(iii) 0.1X SSC, 0.5 % SDS bei 68°C, oder

25 (iv) 0.1X SSC, 0.5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C, oder

(v) 0.2X SSC, 0.1 % SDS bei 42°C, oder

(vi) 2X SSC bei 65°C (moderate Bedingungen).

30 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren bringt man Nukleinsäuren ein, die eine Ketolase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70%, bevorzugter mindestens 75%, bevorzugter mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95%, besonders bevorzugt mindestens 98% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist.

35

Dabei kann es sich um eine natürliche Ketolase-Sequenz handeln, die wie vorstehend beschrieben durch Identitätsvergleich der Sequenzen aus anderen Organismen gefunden werden kann oder um eine künstliche Ketolase-Sequenz, die ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2

5 durch künstliche Variation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgewandelt wurde.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. kon-

10 servative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gin durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen

15 für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

20 Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer.

25 Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Multiple alignment parameter:

Gap opening penalty	10
30 Gap extension penalty	10
Gap separation penalty range	8
Gap separation penalty	off
% identity for alignment delay	40
Residue specific gaps	off
35 Hydrophilic residue gap	off
Transition weighing	0

Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on

K-tuple size	1
Gap penalty	3
5 Window size	5
Number of best diagonals	5

Unter einer Ketolase, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Ketolase verstanden, die bei einem 10 Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 42 % aufweist.

Beispielsweise weist nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme PCC73102* ORF 148 (SEQ ID NO: 4) mit der Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme PCC73102* ORF 38 (SEQ ID NO: 2) eine Identität von 64% auf.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Die "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Ketolase-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Kl-onierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Sequenz der Ketolase aus *Nostoc punctiforme PCC73102* ORF 38 (SEQ ID NO: 2) weist mit den Sequenzen der Ketolasen die in den Verfahren des Standes der Technik verwendet werden

eine Identität von 38% (*Agrobacterium aurantiacum* (EP 735 137, Accession NO: D58420), 38% (*Alcaligenes sp. PC-1* (EP 735137, Accession NO: D58422) und 19 bis 21 % (*Haematococcus pluvialis Flotow em. Wille* und *Haematococcus pluvialis, NIES-144* (EP 725137, WO 98/18910 und Lotan et al, FEBS Letters 1995, 364, 125-128, Accession NO: X86782 und D45881) auf.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich zur erhöhten Ketolase-Aktivität eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität aufweisen.

10 Unter Hydroxylase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxylase verstanden.

Unter einer Hydroxylase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, am, gegebenenfalls substituierten, β -Ionon-Ring von Carotinoiden eine Hydroxy-Gruppe einzuführen.

15

Insbesondere wird unter einer Hydroxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, β -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Hydroxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin verstanden.

Bei einer erhöhten Hydroxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxylase die umgesetzte Menge β -Carotin oder Canthaxanthin bzw. die gebildete Menge Zeaxanthin oder Astaxanthin erhöht.

25 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 30 600 % der Hydroxylase-Aktivität des Wildtyps.

Unter β -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer β -Cyclase verstanden.

Unter einer β -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen β -Ionon-Ring zu überführen.

35 Insbesondere wird unter einer β -Cyclase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Carotin in β -Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter β -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase umgesetzte Menge γ -Carotin bzw. gebildete Menge β -Carotin verstanden.

- 5 Bei einer erhöhten β -Cyclase -Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein β -Cyclase die umgesetzte Menge an Lycopin bzw. γ -Carotin oder die gebildete Menge an γ -Carotin aus Lycopin bzw. die gebildete Menge an β -Carotin aus γ -Carotin erhöht.
- 10 Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der β -Cyclase-Aktivität des Wildtyps.
- 15 Die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität in erfindungsgemäß genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die Aktivität der Hydroxylase wird nach Bouvier et al. (Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328) *in vitro* bestimmt. Es wird zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Ferredoxin, Ferredoxin-NADP Oxidoreductase, Katalase, NADPH sowie β -Carotin mit Mono- und Digalaktosylglyzeriden zugegeben.

Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der Hydroxylase-Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, Keller, d'Harlingue und Camara (Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.); Biochim. Biophys. Acta 1391 (1998), 320-328):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 0.250 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kalumphosphat (pH 7.6), 0.025 mg Ferredoxin von Spinat, 0.5 Einheiten Ferredoxin-NADP+ Oxidoreduktase von Spinat, 0.25 mM NADPH, 0.010 mg beta-Carotin (in 0.1 mg Tween 80 emulgiert), 0.05 mM einer Mischung von Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 1 Einheit Katalyse, 200 Mono- und Digalaktosylglyzeriden (1:1), 0.2 mg Rinderserumalbumin und Organismusextrakt in unterschiedlichem Volumen. Die Reaktionsmischung wird 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte werden mit organischem Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform/Methanol (2:1) extrahiert und mittels HPLC bestimmt.

Die Bestimmung der β -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Organismen und in Wildtyp- bzw. Referenzorganismen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

- 5 Die Aktivität der β -Cyclase wird nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt. Es werden zu einer bestimmten Menge an Organismusextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stomaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben.
- 10 Besonders bevorzugt erfolgt die Bestimmung der β -Cyclase -Aktivität unter folgenden Bedingungen nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclae inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der *in-vitro* Assay wird in einem Volumen von 250 μ l Volumen durchgeführt. Der Ansatz enthält

- 15 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Organismusextrakt, 20 nM Lycopin, 250 μ g an chromoplastidärem Stomaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 10 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.
- 20

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15).

- 25 Die Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder von Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp.
- 30 Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Hydroxylase-Gens und/oder β -Cyclase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Hydroxylase-Genkopien und/oder β -Cyclase-Genkopien, also durch Einbringen mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, in den Organismus.
- 35

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase und/oder β-Cyclase, wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen endogenen Hydroxylase und/oder β-Cyclase verstanden.

- 5 Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxylasen und/oder β-Cyclasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.
- 10 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxylase und/oder β-Cyclase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.
- 15 Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression eines endogenen Hydroxylase- und/oder β-Cyclase-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieses Gens in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine β-Cyclase, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, und/oder durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure, kodierend eine β-Cyclase, in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes Hydroxylase-Gen bzw. jedes β-Cyclase-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine Hydroxylase und jede Nukleinsäure, die eine β-Cyclase kodiert, verwendet werden.

Bei genomicischen Hydroxylase- bzw. β-Cyclase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryotischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende Hydroxylase bzw. β-Cyclase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs, zu verwenden.

Ein Beispiel für ein Hydroxylase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, aus *Haematococcus pluvialis*, Accession AX038729, WO 0061764); (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 5, Protein: SEQ ID NO: 6).

5 Ein Beispiel für ein β -Cyclase-Gen ist eine Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase aus Tomate (Accession X86452). (Nukleinsäure: SEQ ID NO: 7, Protein: SEQ ID NO: 8).

In den erfindungsgemäßen bevorzugten transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres Hydroxylase-Gen
10 und/oder β -Cyclase-Gen vor.

In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der genetisch veränderte Organismus beispielsweise mindestens eine exogene Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase und/oder mindestens eine exogene
15 Nukleinsäure, kodierend eine β -Cyclase, oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine β -Cyclase, auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als Hydroxylase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz
20 SEQ ID NO: 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 6, und die die enzymatische Eigenschaft einer Hydroxylase aufweisen.

25 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID. NO: 6 leicht auffinden.

30 Weitere Beispiele für Hydroxylasen und Hydroxylase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 5 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, wie vorstehend beschrieben, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

35 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxylase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Hydroxylase der Sequenz SEQ ID NO: 6.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- 5 Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht er-mitteln.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 5, in den Organismus ein.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform als β -Cyclase-Gene Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50 %, bevorzugter mindestens 70 %, noch bevorzugter mindestens 90 %, am bevorzugtesten mindestens 95 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 8, und die die enzymati-sche Eigenschaft einer β -Cyclase aufweisen.

- 20 Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich beispielsweise aus verschie-denen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie vorstehend beschrieben durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der SEQ ID NO: 8 leicht auffinden.
- 25 Weitere Beispiele für β -Cyclasen und β -Cyclase-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 7 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
- 30 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der β -Cyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Ami-nosäuresequenz der β -Cyclase der Sequenz SEQ. ID. NO: 8.
- 35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptid-sequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Kodons verwendet, die entsprechend des Organismus-spezifischen "codon usage" häufig verwendet werden. Dieser "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht er-mitteln.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO: 7 in den Organismus ein.

Alle vorstehend erwähnten Hydroxylase-Gene oder β -Cyclase-Gene sind weiterhin in an sich 10 bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press 15 New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren genetisch veränderte Organis-20 men mit folgende Kombinationen genetischer Veränderungen verwendet:

Genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität aufweisen,

25 genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität aufweisen und

genetisch veränderte Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte oder verursachte Ketolase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und eine erhöhte β -Cyclase-Aktivität 30 aufweisen.

Die Herstellung dieser genetisch veränderten Organismen kann, wie nachstehend beschrieben, beispielsweise durch Einbringen einzelner Nukleinsäurekonstrukte (Expressionskassetten) oder durch Einbringen von Mehrfachkonstrukten erfolgen, die bis zu zwei oder drei der beschrie-be-nen Aktivitäten enthalten.

35

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β -

Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine 5 Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

10 Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage 15 sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes sp. PC-1*, *Flavobacterium sp. strain R1534*, das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

25 Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

30 Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus pluvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

35 Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Bras-

sicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

5 Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen *Marigold*, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcurbita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelserium*, *Genista*,
10 *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Helopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*,
15 *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

20 Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen ein Ernten der Organismen und weiter bevorzugt zusätzlich ein Isolieren von Ketocarotinoiden aus den Organismen angeschlossen.

25 Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

30 Die Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt bevorzugt in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C, wie z.B. 20°C bis 40°C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9. Bei genetisch veränderten Mikroorganismen erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Ketolaseexpression in Gegenwart von Sauerstoff, z.B. 12 Stunden bis 3 Tage, fortgesetzt.

35

Die Isolierung der Ketocarotinoide aus der geernteten Biomasse erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

Wie nachstehend erwähnt, können die Ketocarotinoide in den erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen vorzugsweise in verschiedenen Pflanzengeweben, wie beispielsweise Samen, Blätter, Früchte, Blüten, insbesondere in Blütenblättern spezifisch hergestellt werden.

Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Ketocarotinoiden aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (*Phytochemistry* (1967) 6, 437-440) und Egger (*Phytochemistry* (1965) 4, 609-618) beschrieben.

Vorzugsweise sind die Ketocarotinoide ausgewählt aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

Ein besonders bevorzugtes Ketocarotinoid ist Astaxanthin.

Je nach verwendetem Organismus fallen die Ketocarotinoide in freier Form oder als Fettsäureester an.

In Blütenblättern von Pflanzen fallen die Ketocarotinide im erfindungsgemäßen Verfahren in Form ihrer Mono- oder Diester mit Fettsäuren an. Einige nachgewiesene Fettsäuren sind z.B. Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinäure, Ölsäure, Linolensäure, und Laurinsäure (Kamata und Simpson (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 86B(3), 587-591).

Die Herstellung der Ketocarotinoide kann in der ganzen Pflanze oder in einer bevorzugten Ausführungsform spezifisch in Pflanzengeweben, die Chromoplasten enthalten, erfolgen. Bevorzug-

te Pflanzengewebe sind beispielsweise Wurzeln, Samen, Blätter, Früchte, Blüten und insbesondere Nektarien und Blütenblätter, die auch Petalen bezeichnet werden.

5 In einer besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Blüten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem blütenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

15 In einer weiteren, besonderes bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Früchten die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines fruchtspezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem fruchtspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

25 In einer weiteren, besonderes bevorzugten, Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man genetisch veränderte Pflanzen, die in Samen die höchste Expressionsrate einer Ketolase aufweisen.

Vorzugsweise wird dies dadurch erreicht, dass die Genexpression der Ketolase unter Kontrolle eines samenspezifischen Promoters erfolgt. Beispielsweise werden dazu die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, wie nachstehend ausführlich beschrieben, in einem Nukleinsäurekonstrukt funktionell verknüpft mit einem samenspezifischen Promotor in die Pflanze eingebracht.

Das Targeting in die Chromoplasten erfolgt durch ein funktionell verknüpftes plastidäres Transpeptid.

35 Im folgenden wird exemplarisch die Herstellung genetisch veränderter Pflanzen mit erhöhter oder verursachter Ketolase-Aktivität beschrieben. Die Erhöhung weiterer Aktivitäten, wie beispielsweise der Hydroxylase-Aktivität und/oder der β -Cyclase-Aktivität kann analog unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Hydroxylase bzw. β -Cyclase anstelle von

Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, erfolgen. Die Transformation kann bei den Kombinationen von genetischen Veränderungen einzeln oder durch Mehrfachkonstrukte erfolgen.

- 5 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangspflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 10 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierende Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten, aber nicht darauf beschränkten Sequenzen, sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärkern wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Als Promotor der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228), der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202), den Triose-Phosphat Translokator (TPT) Promotor aus *Arabidopsis thaliana* Acc.-No. AB006698 , Basenpaar 53242 bis 55281; das Gen beginnend ab bp 55282 ist mit "phosphate/triose-phosphate translocator" annotiert, oder den 34S Promoter aus Figwort mosaic virus Acc.-No. X16673, Basenpaar 1 bis 554.

Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalin synthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), der Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), der Smas Promotor, der Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungsinduzierbare Promotoren wie der des pinII-Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel, Samen und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin-Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

5

Blüten spezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen-Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593), der AP3 Promoter aus *Arabidopsis thaliana* (siehe Beispiel 5), der CHRC-Promoter (Chromoplast-specific carotenoid-associated protein (CHRC) gene promoter aus *Cucumis sativus* Acc.-No. AF099501, Basenpaar

10 1 bis 1532), der EPSP_Synthase Promotor (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. M37029, Basenpaar 1 bis 1788), der PDS Promotor (Phytoene desaturase gene promoter aus *Solanum lycopersicum*, Acc.-No. U46919, Basenpaar 1 bis 2078), der DFR-A Promotor (Dihydroflavonol 4-reductase gene A promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. X79723, Basenpaar 32 bis 1902) oder der FBP1 Promotor (Floral Binding

15 Protein 1 gene promoter aus *Petunia hybrida*, Acc.-No. L10115, Basenpaar 52 bis 1069).

Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), der glob-I Promotor oder der g-Zein Promotor.

20 Samen-spezifische Promotoren sind beispielsweise der ACP05-Promotor (Acyl-carrier-Protein Gen, WO9218634), die Promotoren AtS1 und AtS3 von *Arabidopsis* (WO 9920775), der LeB4-Promotor von *Vicia faba* (WO 9729200 und US 06403371), der Napin-Promotor von *Brassica napus* (US 5608152; EP 255378; US 5420034), der SBP-Promotor von *Vicia faba* (DE 9903432) oder die Maispromotoren End1 und End2 (WO 0011177).

25

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

30 Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren sind konstitutive, samenspezifische, fruchtspezifische, blüten spezifische und insbesondere blütenblattspezifische Promotoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher insbesondere ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell verknüpft einen blüten spezifischen oder insbesondere einen blütenblattspezifischen Promotor und eine Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promoters mit einer vorstehend beschriebenen Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach 5 gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene 10 Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987), beschrieben sind.

Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren, kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

15 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ketolase-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chromoplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation der Ketolase in die Chromoplasten vom Ketolase-Teil enzymatisch abgespalten werden.

20 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

25 Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

30 pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCT
TCCCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCTTCTCT-
CACTTTTCCGGCTTAAATCCAATCCAATATCACCCACCTCCGCCGCCG-

35 TACTCCTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGTCGTAAGGTCAACCAGGCGATTGTCGCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAATGAGACTGCGGGATCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTG
TCCCTGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-
CACTTTTCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCACTCCGCCGCG-
TACTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCGGGGATTCGTGCGCT-
5 CAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAATGAGACTGCGCTGGATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTG
10 TCCCTGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTCCCCTTCTCT-
CACTTTTCGGCCTAAATCCAATCCAATATCACCACTCCGCCGCG-
TACTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCGTAAGGTACCGGGGATTCGTGCGCT-
CAGCTGCAACCGAAACCATAAGAGAAAATGAGACTGCGGGGATCC_BamHI

15 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabisopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (*rbcS*) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. *Nucl. Acids Res.* 16: 11380).

20 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

25 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

30 Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
35

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8,

vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'

5 Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res.

10 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. EMBO J. 3: 835-846).

15

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

20

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

25

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiAch5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

30

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt

35 werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation tro-

ckener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in 5 Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, 10 *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

Mit einem Expressionsplasmid transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

15 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Ketolase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 und pSUN3 kloniert, der geeignet ist, in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert zu werden. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

25 Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen 30 für die Expression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Ketolase kodierenden Nukleinsäure wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispiels-

weise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16 :11380), pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

5

Im folgenden wird die Herstellung der erfindungsgemäßen gentisch veränderten Mikroorganismen näher beschrieben:

Die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase oder β -Hydroxylase oder
10 β -Cyclase sind vorzugsweise in Expressionskonstrukte eingebaut, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Enzym kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

15 Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.
20

Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Translationsverstärker, Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen.
25

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im
30 Genkonstrukt enthalten sein.
35

Beispiele für brauchbare Promotoren in Mikroorganismen sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, lambda-PR- oder im lambda-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die

gram-positiven Promotoren amy und SPO2 oder die Hefepromotoren ADC1, MFa , AC, P-60, CYC1, GAPDH. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der P_rPromotor.

5 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder 10 dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke 15 Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

20 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, kodierend eine Ketolase, β-Hydroxylase oder β-Cyclase sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring 25 Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

30 Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch 35 alle anderen dem Fachmann bekannte Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5

5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315)

und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Aca-

10 demic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89) oder pBluescript und pUC-Vektoren.

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYEpSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).

15 Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 20 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol.. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

25 Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

30 Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte bzw. Vektoren sind genetisch veränderte Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind.

35 Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Ex-

pression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Marker gene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Marker-gene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion kataly-sieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automati-scher Zellsortierung selektiert werden.

5 Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibioti-karesistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibioti-ka-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

10 Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder andere temperante Phagen oder Transpo-sons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem.

15 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organis-men, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend funktionell ver-knüpft einen Promotor und Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäure-sequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deleti-on von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Amino-säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, und gegebenenfalls einen Terminator in 20 das Genom des Ausgangsorganismus oder extrachromosomal in den Ausgangsorganismus einführt.

25 Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Organismen, wobei die genetische Ver-änderung die Aktivität einer Ketolase

30 A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, ge-genüber dem Wildtyp erhöht und

35 B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivitätaufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verur-sacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz

durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Wie vorstehend ausgeführt erfolgt die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp vorzugsweise durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt, wie vorstehend ausgeführt, die Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, in die Pflanzen und damit vorzugsweise durch Überexpression oder transgene Expression von Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus keine Ketolase oder eine endogen Ketolase aufweist und eine transgene Ketolase überexprimiert wird.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist. Dies ist der Fall, wenn der Ausgangsorganismus eine endogene Ketolase aufweist und die endogene Ketolase überexprimiert wird.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Organismen weisen, wie vorstehend erwähnt, zusätzlich eine erhöhte Hydroxylase-Aktivität und/oder β -Cyclase-Aktivität gegenüber einem Wildtyporganismus auf. Weiter bevorzugte Ausführungsformen sind vorstehend im erfindungsgemäßen Verfahren beschrieben.

Unter Organismen werden erfindungsgemäß vorzugsweise Organismen verstanden, die als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung und/oder Umregulierung der Stoffwechselwege in der Lage sind, Carotinoide, insbesondere β-Carotin und/oder Zeaxanthin und/oder Neoxanthin und/oder Violaxanthin und/oder Lutein herzustellen.

Weiter bevorzugte Organismen weisen als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen bereits eine Hydroxylase-Aktivität auf und sind somit als Wildtyp- oder Ausgangsorganismen in der Lage, Zeaxanthin herzustellen.

10

Bevorzugte Organismen sind Pflanzen oder Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

15

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Escherichia*, die beispielsweise crt-Gene aus *Erwinia* enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc* oder Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*.

20

Bevorzugte Bakterien sind *Escherichia coli*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia uredovora*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* sp. PC-1, *Flavobacterium* sp. strain R1534, das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803, *Paracoccus marcusii* oder *Paracoccus carotinifaciens*.

25

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia* oder *Phaffia*. Besonders bevorzugte Hefen sind *Xanthophyllomyces dendrorhous* oder *Phaffia rhodozyma*.

30

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

35

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus pluvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

Weitere brauchbare Mikroorganismen und deren Herstellung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind beispielsweise aus der DE-A-199 16 140 bekannt, worauf hiermit Bezug genommen wird.

Besonders bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Ganz besonders bevorzugte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcurbita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliospasis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Maratia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* oder *Zinnia*, besonders bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium*, *Tropaeolum* oder *Adonis*.

Ganz besonders bevorzugte genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Adonis*, *Lycopersicon*, *Rosa*, *Calendula*, *Physalis*, *Medicago*, *Helianthus*, *Chrysanthemum*, *Aster*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Petunia*, *Geranium* oder *Tropaeolum*, wobei die genetisch veränderte Pflanze mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthält.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Früchte, Samen, Blüten und Blütenblätter sind ein weiterer Gegengstand der vorliegenden Erfindung.

Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin verwendet werden.

Von Menschen und Tieren verzehrbar erfindungsgemäß, genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen oder Pflanzenteile, wie insbesondere Blütenblätter mit erhöhtem Gehalt an Ketocarotinoiden, insbesondere Astaxanthin können auch beispielsweise direkt oder nach

an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

Ferner können die genetisch veränderten Organismen zur Herstellung von Ketocarotinoid-

5 haltigen Extrakten der Organismen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

Die genetisch veränderten Organismen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden auf.

10

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Ketocarotinoid verstanden.

Unter einem erhöhten Gehalt an Ketocarotinoiden wird aber auch insbesondere ein veränderter

15 Gehalt der bevorzugten Ketocarotinoide verstanden, ohne dass zwangsläufig der Gesamt-Carotinoidgehalt erhöht sein muss.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Astaxanthin auf.

20

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Die Erfindung betrifft ferner die neuen Ketolasen sowie die neuen Nukleinsäuren, die diese

25 kodieren.

Insbesondere betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO.

2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75 %,

30 besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 2 nicht enthalten ist. Die Sequenz SEQ ID NO: 2 ist, wie vorstehend erwähnt, als putatives Protein in Datenbanken annotiert.

35

Ferner betrifft die Erfindung Ketolasen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz

SEQ. ID. NO. 4 aufweist. Die Sequenz SEQ ID NO: 4 ist, wie vorstehend erwähnt, in Datenbanken nicht annotiert.

Die Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, kodierend ein vorstehend beschriebenes Protein, mit
5 der Maßgabe, dass die Nukleinsäure nicht die Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder 3 enthält.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäuresequenz
SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise min-
10 destens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevorzugter
mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ.
ID. NO. 2 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäurese-
15 quenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion
von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 %, vorzugsweise
mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, bevorzugter mindestens 85%, bevor-
zugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz
SEQ. ID. NO. 2 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

20 Ferner wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Protein enthaltend die Aminosäurese-
quenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion
von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise
mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, be-
vorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf
25 Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist,
eine Eigenschaft als Ketolase aufweist.

30 Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäurese-
quenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion
von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65%, vorzugsweise
mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 75%, besonders bevorzugt mindestens 80%, be-
vorzugter mindestens 85%, bevorzugter mindestens 90%, bevorzugter mindestens 95% auf A-
35 minosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist,
als Ketolase.

Im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik, liefert das erfindungsgemäße Verfah-
ren eine höhere Menge an Ketocarotinoide, insbesondere Astaxanthin.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiel 1:

5 Amplifikation von cDNA, die die gesamte Primärsequenz der Ketolasen aus *Nostoc punctiforme* PCC73102 ORF 38, contig 501 (SEQ ID NO: 1) und ORF 148, contig 502 (SEQ ID NO: 3) kodiert

10 Zellen von *Nostoc punctiforme* wurden mit Lysozym (2 mg/ml) aufgeschlossen und die genomische DNA mit Hilfe des GenElute Plant genomic DNA kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers isoliert.

15 Dann erfolgte die Amplifikation von ORF148 (762 bp) aus der genomischen DNA von *Nostoc punctiforme* mit Hilfe der Primer 148-Start (SEQ ID NO: 9; 5' ATG ATC CAG TTA GAA CAA CCA C -3') und 148-End (SEQ ID NO: 10; 5' CTA TTT TGC TTT GTA AAT TTC TGG -3') bei einer AnnnelingTemperatur von 60°C über 30 Zyklen.

20 Zur Amplifizierung von ORF38 (789 bp) wurden die Primer 38-Start (SEQ ID NO: 11; 5' ATG AAT TTT TGT GAT AAA CCA GTT AG -3') und 38-End (SEQ ID NO: 12; 5' ACG AAT TGG TTA CTG AAT TGT TG -3') verwendet.

25 Die PCR Fragmente wurden in den mit *Xcm*I geschnittenen Vektor pMON 38201 (Borokov, A.Y. and Rivkin, M.I. (1997) *Xcm*I containing vector for direct cloning of pcr products. BioTech. 22, 812-814) subkloniert.

30 Zur Selektion positiver Klone wurde nach der Transformation der Ligationsprodukte in X11 blue MRF1 ein blau-weiss screening durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit *Hind*III geschnitten, um zu überprüfen ob das PCR Amplifikat in den T-Überhangvektor kloniert wurde. Die Sequenzierung der ausgewählten Klone zeigte, dass die Orientierung von ORF148 in pMONT-148, bzw. ORF38 in pMONT-38, entgegen der vektoriellen Leserichtung ist. Das Herausschneiden des Inserts durch *Hind*III war möglich, da der T-Überhang Vektor neben der *Hind*III Schnittstelle im Polylinker noch eine zweite besitzt, die beim Einfügen des Polylinkers entstanden ist.

Beispiel 2

35 Herstellung von Expressionsvektoren zur Expression der *Nostoc punctiforme* PCC73102 Ketolasen *ORF148* und *ORF38* in Wirtsorganismen.

Nach Restriktionsverdau von pMONT148 bzw. pMONT38 mit *Hind*III wurden die erhaltenen DNA-Inserts in einen ebenfalls *Hind*III verdauten und dephosphorylierten pPQE32 Vektor (Qia-

gen, Hilden; modifiziert wie in (Verdoes, J., Krubasik, P., Sandmann, G. & van Ooyen, M. (1999) Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molec. Genet.* 262, 453-461) beschrieben kloniert.

5 Die nach Transformation in XL1MRF1' erhaltenen Klone wurden mit Hilfe einer check PCR unter Verwendung von Primer QEF (5' CCC TTT CCT CTT CTC -3') und 148-end bzw. 38-end überprüft. Die Sequenzierungen der entsprechenden Klone zeigte, dass ORF148 und ORF38 in frame in den pPQE32 Vektor kloniert wurden. Die so erhaltenen Plasmide sind in Abbildung 2B und 2C dargestellt. Abbildung 2 zeigt die Konstruktion von pPQE32-ORF 148 (B.) und pPQE32-
10 ORF 38 (C.) ausgehend von pPQE32 (A.).

Beispiel 3

Expression der *Nostoc punctiforme PCC73102* Ketolasen ORF148 und ORF38 in β-Carotin und Zeaxanthin produzierenden *E. coli* Stämme und Analyse des Carotinoidprofils

15 3.1. Expression der *Nostoc punctiforme PCC73102* Ketolasen ORF148 und ORF38 in β-Carotin produzierenden *E. coli* Stämme

Zur funktionellen Charakterisierung der durch ORF148 und ORF38 gebildeten Genprodukte
20 wurden die Konstrukte pPQE32-148 und pPQE32-38 in die β-Carotin bildende *E.coli* Transformante JM101/pACCAR16ΔcrtX (Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T. Ohtani, T. & Miki, W. (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 22, 6575-6584) transformiert.

25 Die Anzucht der Transformanden erfolgte in 50 ml Kulturen mit LB Medium bei 28°C im Dunkeln für 16 bis 48 Stunden. Die Carotinoide wurden mit Methanol extrahiert, gegen 50% Ether/Petrolether ausgeschüttelt und die erhaltenen Extrakte über HPLC (Säule HypurityC18, Laufmittel: Acetonitril/Methanol/2-Propanol 85:10:5, Temperatur 32°C) aufgetrennt. Die Spektren
30 wurden mittels eines Diioden-Array Detektors on-line aufgezeichnet und die Carotinoide anhand ihrer Absorptionsmaxima sowie im Vergleich mit Standards identifiziert.

35 Wie in Abbildung 3A für pPQE32-38 und 3B für pPQE32-148 gezeigt, konnten neben dem Ausgangssubstrat β-Carotin in beiden Extrakten die Ketocarotinoide Echinenon und Canthaxanthin detektiert werden (in Kontrollen ohne pPQE32-38 bzw. pPQE32-148 war nur β-Carotin aber keine Ketocarotinoide zu finden).

Der Anteil des gebildeten Canthaxanthins (Diketo-Verbindung) am Gesamtcarotinoidgehalt betrug in der Komplementierung mit pPQE32-148 81%, in der Komplementierung mit pPQE32-38

lag er bei 40%. Der Anteil an Echinenon (Monoketo-Verbindung) lag in beiden Komplementierungen bei etwa 4%.

3.2. Expression der *Nostoc punctiforme* PCC73102 Ketolasen ORF148 und ORF38 in Zeaxanthin produzierenden *E. coli* Stämme

Um zu untersuchen in wie weit die durch ORF148 und ORF38 kodierten Ketolasen in der Lage sind das Ketocarotinoid Astaxanthin zu synthetisieren, wurden pPQE32-38 (Abb. 3C) und pPQE32-148 (Abb. 3D) in die Zeaxanthin bildende *E. coli* Transformande

10 JM101/pACCAR25ΔcrtX (Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T. Ohtani, T. & Miki, W. (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. J. Bacteriol. 22, 6575-6584) transformiert.

15 Die Anzucht der Transformanden, die Carotinoidextraktion und die HPLC Trennung erfolgte wie oben unter 3.1 beschrieben. Während in dem aus der Komplementierung mit pPQE32-38 erhaltenen Extrakt nur die Ausgangssubstrate Zeaxanthin und β-Carotin, 85 bzw. 5% des Gesamtcarotinidgehalts, nachgewiesen werden konnten, konnten in der Komplementierung mit pPQE32-148 hauptsächlich die Ketocarotinoide Echinenon, Canthaxanthin und Astaxanthin detektiert

20 werden. Der Anteil von Astaxanthin am Gesamtcarotinidgehalt beträgt 50%. Die Intermediate der Astaxanthinsynthese Echinenon und Canthaxanthin stellen 12% bzw. 8% des Gesamtcarotinoids dar. Der Anteil an β-Carotin beträgt etwa 30%.

Abbildung 3 zeigt die HPLC Trennung der Carotinoide aus Komplementierung in *E. coli* mit einem β-Carotin Hintergrund kotransformiert mit pPQE32-38 (A) oder pPQE32-148 (B) bzw. in *E. coli* mit einem Zeaxanthin Hintergrund kotransformiert mit pPQE32-38 (C) oder pPQE32-148 (D).

Die angegebenen Carotinoide wurden durch Kochromatographie mit Vergleichssubstanzen und über ihre Spektren identifiziert als:

1 Canthaxanthin,
2 Echinenon,
3 β-Carotin,
4 Zeaxanthin,
35 5 Astaxanthin,
6 β-Cryptoxanthin,
7 Neurosporin.

1', 3', 4' und 5' bezeichnen die entsprechenden cis Isomere.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen, die im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Ketolase-Aktivität aufweisen, und die veränderte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp bereits eine Ketolase-Aktivität aufweisen, und die genetische Veränderung eine Erhöhung der Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp bewirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Ketolase-Aktivität die Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Organismen verwendet, die als Wildtyp keine Ketolase-Aktivität aufweisen und die genetische Veränderung eine Ketolase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp verursacht.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Organismen verwendet, die transgen eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, exprimieren.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in die Organismen einbringt, die Ketolasen kodieren,

enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 einbringt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β-Cyclase-Aktivität, aufweisen.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren, kodierend eine Hydroxylase, und Nukleinsäuren, 15 kodierend eine β-Cyclase, gegenüber dem Wildtyp erhöht.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung der Genexpression mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxylase und Nukleinsäuren kodierend eine β-Cyclase in den Organismus 20 einbringt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine Hydroxylase, Nukleinsäuren einbringt, die eine Hydroxylase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 6 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, 25 Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 aufweist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 5 einbringt.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass man als Nukleinsäure, kodierend eine β-Cyclase, Nukleinsäuren einbringt, die eine β-Cyclase kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 8 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 35 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO: 8 aufweist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man Nukleinsäuren, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO: 7 einbringt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Organismen erntet und anschließend die Ketoncarotinoide aus den Organismen isoliert.
- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus einen Organismus verwendet, der als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung oder Umregulierung von Stoffwechselwegen in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismen Mikroorganismen oder Pflanzen verwendet.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Mikroorganismen Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze verwendet.
- 15 20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Phaffia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornutum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
21. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus Pflanzen verwendet.
- 25 22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Armaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iiliaceae oder Lamiaceae verwendet.
- 30 23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcurbita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Li-*

num, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder

5 Zinnia verwendet.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketocarotinoide ausgewählt sind aus der Gruppe Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin.

10

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Ketolase

A für den Fall, dass der Wildtyporganismus bereits eine Ketolase-Aktivität aufweist, gegenüber dem Wildtyp erhöht und

B für den Fall, dass der Wildtyporganismus keine Ketolase-Aktivitätaufweist, gegenüber dem Wildtyp verursacht

20 und die nach A erhöhte oder nach B verursachte Ketolase-Aktivität durch eine Ketolase verursacht wird, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung oder Verursachung der Ketolase-Aktivität durch eine Erhöhung oder Verursachung der Genexpression einer Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

30

27. Genetisch veränderter Organismuse nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Genexpression Nukleinsäuren in den Organismus einbringt, die Ketolasen kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der

35

Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

28. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens eine transgene Nukleinsäure, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
5
29. Genetisch veränderter Organismus, enthaltend mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, kodierend eine Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 42 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.
10
- 15 30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxylase-Aktivität und β-Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp erhöht.
- 20 31. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 30, dadurch gekennzeichnet daß er als Ausgangsorganismus natürlicherweise oder durch genetische Komplementierung in der Lage ist, Carotinoide herzustellen.
- 25 32. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 31, ausgewählt aus der Gruppe Mikroorganismen oder Pflanzen.
33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.
- 30 34. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen ausgewählt sind aus der Gruppe *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*.
35
35. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen ausgewählt sind aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Pri-

mulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iilliaceae oder Lamniaceae verwendet.

- 5 36. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass Pflanzen ausgewählt sind aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta, Tagetes patula, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevillea, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
- 10 37. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- oder Nahrungsmittel.
- 15 38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Ketocarotinoid-haltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
- 20 39. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 2 nicht enthalten ist.
- 25 40. Ketolase, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 aufweist.
- 30 41. Nukleinsäure, kodierend ein Protein gemäß 39 oder 40, mit der Maßgabe, dass die Sequenz SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 nicht enthalten sind.

42. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 70 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.
- 5
43. Verwendung eines Proteins, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 4 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 65 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 4 und die Eigenschaft einer Ketolase aufweist, als Ketolase.

Abbildung 1

Nukleotidsequenz ORF 38 (786 bp)

TTGAATTTGTGATAAACCAAGCTAGCTATTATGTTGCAATAGAGCAATTAAGTGCTAA-
5 GAAGATACTGTTGGGGCTGGTGTAGTCATAGTAATTATTAGTCTTGGTAGC-
TAGTTGGCTTTACTAGCTATTAAATTATGCCAAAGTCCAATTGGTTGATACCTATTG-
CAATAGTTGGCAAATGTCCTTATACAGGGCTATTATTACTGCACATGATGCTATG-
CATGGGTCAAGTTATCGTAAAAATCCAAAATTAAATAATTATCGGTTCACTAGCTG-
TAGCGCTTACGCTGTGTTCCATATCACAGATGTTAAGAAATCATTGCTTACAT-
10 CATCGTCATCCTGCTAGCGAAGTTGACCCAGATTTCATGATGGTAAGAGAACAAACGC-
TATTTCTGGTATCTCCATTTCATGATAGAATACTCCAGTTGGCAACAGTTAATAGTAC-
TAACATCCTATTAAATTAGCTAAATACGTTGCACATCCATCAAATAATCTCATCT-
TATTTGGAGTATCCTCCAATTAAAGTCCATTCAACTGTTTATCCCCATTGCAGCCAAACAA-
15 TAAAATTGCCAACTTTTGTCATTATCGCTTGCTACCACCTTGGTTATCATGAAGAACAT-
CATGAGTATCCCCATGTACCTGGTGGCAACTCCATCTGTATATAAGCAGAGAGTATT-
CAACAATTCACTAACCAATTCACTAA

20 Nukleotidsequenz ORF 148 (759 bp)

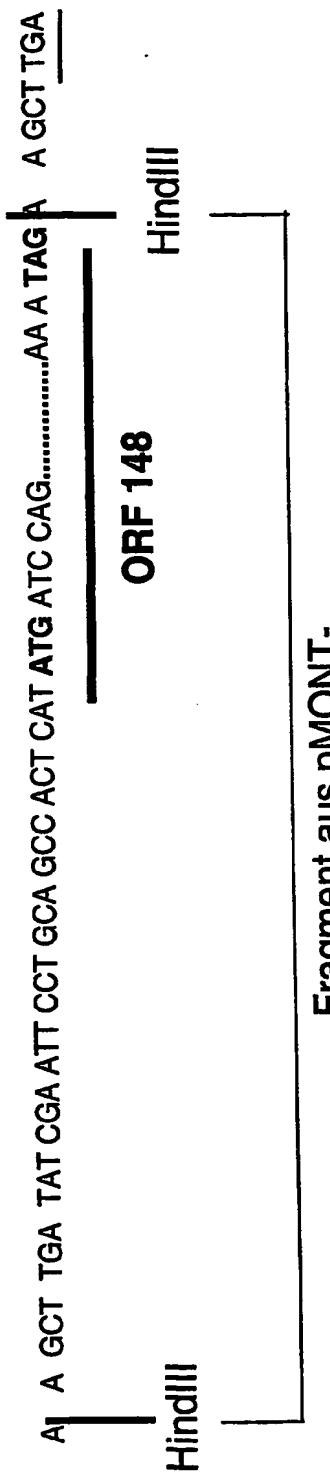
GTGATCCAGTTAGAACAAACCAACTCAGTCATCAAGCAAAACTGACTCCAGTACTGAGAACGTA
AATCTCAGTTAAGGGGCTTCATTGCTATTGTCATTGTTAGCGCATGGGTCTTGCCTG-
AGTTTATTACTTCCCTGACATCTCAAAGCTAAATTTGGATGTTATTGCCTGTTACTA
TGGCAAACATTATATACGGGATTATTACATCTCATGATGCCATGCATGGCGTAG-
25 TATTCCCCAAACACCAAGATTAATCATTGATTGAAACATTGACCCATTCCCTT-
TATGGTCTTTACCATATCAAAAACATTGAAAAACATTGGTTACACCACCAATCCAG-
CAAGCTCAATAGACCCGGATTTCACAAATGGTAAACACCAAGTTCTTGCTTGG-
TATTTCAATTATGAAAGGTTACTGGAGTTGGGGCAAATAATTGCGTTGACTATTATT-
TATAACTTTGCTAAATACATACTCCATATCCCAGTGATAATCTAACTTACCTTGGTGC-
30 TACCCCTCGCTTTAAGTTCATTACAATTATTCTATTGGTACTTTTACCCATAGT-
GAACCAATAGGGGTTATGTCAGCCTCATTGTGCCAAACAATTAGCCGTCC-
TATTTGGTGGTCATTATCACGTGCTATCATTGGTACCCACGAGGAACATCACGAA-
TATCCTCATATTCTTGGTGGCAGTTACCAAGAAATTACAAAGCAAAATAG

A

pPQE3 — CAT CAC CAT CAC GGG A TC CGC A TG CGA G CT CGG TAC CCC GGG TCG ACC TGC

2/3

B



C

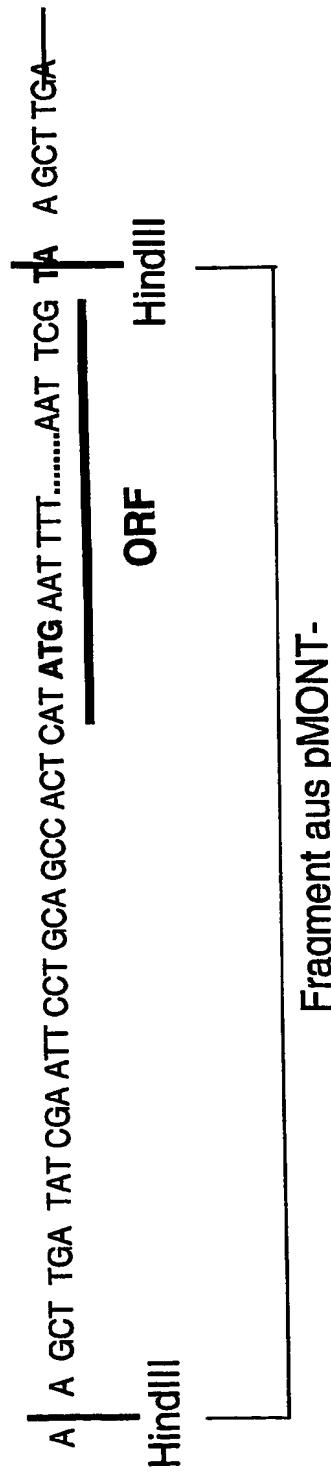
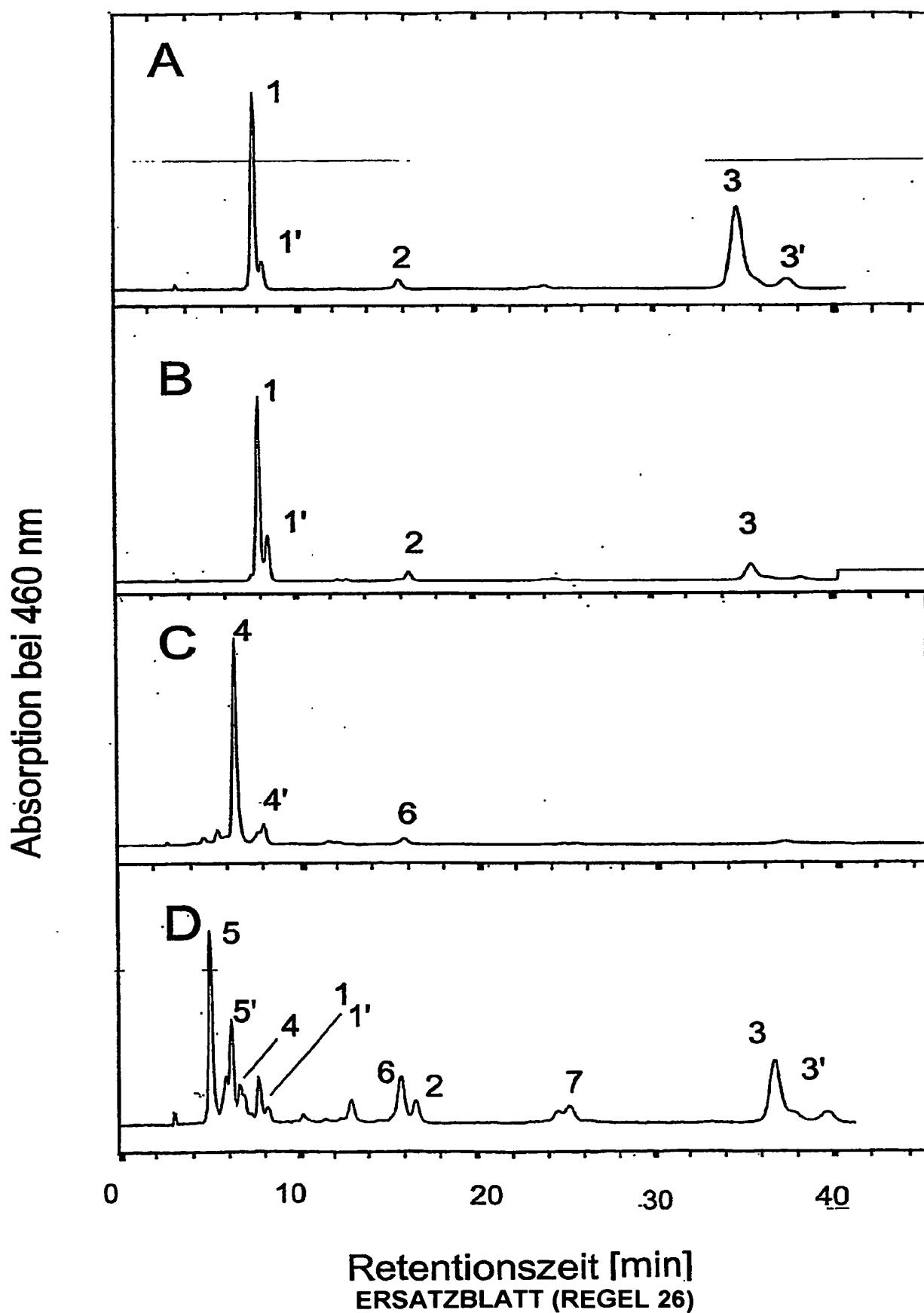


Abbildung 3



Sequenzprotokoll

<110> BASF Aktiengesellschaft
 5 <120> Verfahren zur Herstellung von Ketocarotinoiden durch Kultivierung von genetisch veränderten Organismen
 <130> AE 20020904
 10 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.1
 15 <210> 1
 <211> 789
 20 <212> DNA
 <213> Nostoc sp., PCC73102
 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (1) .. (789)
 30 <223>
 <400> 1
 35 ttg aat ttt tgt gat aaa cca gtt agc tat tat gtt gca ata gag caa 48
 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln
 1 5 10 15
 40 tta agt gct aaa gaa gat act gtt tgg ggg ctg gtg att gtc ata gta 96
 Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val
 20 25 30
 att att agt ctt tgg gta gct agt ttg gct ttt tta cta gct att aat 144
 Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn
 45 35 40 45
 tat gcc aaa gtc cca att tgg ttg ata cct att gca ata gtt tgg caa 192
 Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln
 50 55 60
 50 atg ttc ctt tat aca ggg eta ttt att act gca cat gat gct atg cat 240
 Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His
 65 70 75 80
 55 ggg tca gtt tat cgt aaa aat ccc aaa att aat aat ttt atc ggt tca 288
 Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
 90 95
 60 cta gct gta gcg ctt tac gct gtg ttt cca tat caa cag atg tta aag 336
 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
 100 105 110
 65 aat cat tgc tta cat cat cgt cat cct gct agc gaa gtt gac cca gat 384
 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
 115 120 125
 ttt cat gat ggt aag aga aca aac gct att ttc tgg tat ctc cat ttc 432
 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe

2/15

	130	135	140	
5	atg ata gaa tac tcc agt tgg caa cag tta ata gta cta act atc cta Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu 145 150 155 160			480
10	ttt aat tta gct aaa tac gtt ttg cac atc cat caa ata aat ctc atc Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile 165 170 175			528
15	tta ttt tgg agt att cct cca att tta agt tcc att caa ctg ttt tat Leu Phe Trp Ser Ile Pro Pro Ile Leu Ser Ser Ile Gln Leu Phe Tyr 180 185 190			576
20	ttc gga aca ttt ttg cct cat cga gaa ccc aag aaa gga tat gtt tat Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr 195 200 205			624
25	ccc cat tgc agc caa aca ata aaa ttg cca act ttt ttg tca ttt atc Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile 210 215 220			672
30	gct tgc tac cac ttt ggt tat cat gaa gaa cat cat gag tat ccc cat Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240			720
35	aat tca gta acc aat tcg taa Asn Ser Val Thr Asn Ser 260			789
40	<210> 2 <211> 262			
45	<212> PRT <213> Nostoc sp. PCC73102			
50	<400> 2 Leu Asn Phe Cys Asp Lys Pro Val Ser Tyr Tyr Val Ala Ile Glu Gln 1 5 10 15			
55	Leu Ser Ala Lys Glu Asp Thr Val Trp Gly Leu Val Ile Val Ile Val 20 25 30			
60	Ile Ile Ser Leu Trp Val Ala Ser Leu Ala Phe Leu Leu Ala Ile Asn 35 40 45			
65	Tyr Ala Lys Val Pro Ile Trp Leu Ile Pro Ile Ala Ile Val Trp Gln 50 55 60			
70	Met Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ala His Asp Ala Met His 75 80			

3/15

Gly Ser Val Tyr Arg Lys Asn Pro Lys Ile Asn Asn Phe Ile Gly Ser
85 90 95

5 Leu Ala Val Ala Leu Tyr Ala Val Phe Pro Tyr Gln Gln Met Leu Lys
100 105 110

10 Asn His Cys Leu His His Arg His Pro Ala Ser Glu Val Asp Pro Asp
115 120 125

15 Phe His Asp Gly Lys Arg Thr Asn Ala Ile Phe Trp Tyr Leu His Phe
130 135 140

20 Met Ile Glu Tyr Ser Ser Trp Gln Gln Leu Ile Val Leu Thr Ile Leu
145 150 155 160

25 Phe Asn Leu Ala Lys Tyr Val Leu His Ile His Gln Ile Asn Leu Ile
165 170 175

30 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Arg Glu Pro Lys Lys Gly Tyr Val Tyr
195 200 205

35 Pro His Cys Ser Gln Thr Ile Lys Leu Pro Thr Phe Leu Ser Phe Ile
210 215 220

40 Ala Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His
225 230 235 240

45 Val Pro Trp Trp Gln Leu Pro Ser Val Tyr Lys Gln Arg Val Phe Asn
245 250 255

50 <210> 3

<211> 762

<212> DNA

55 <213> Nostoc sp. PCC73102

60 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(762)

65 <223>

	<400> 3		
5	gtg atc cag tta gaa caa cca ctc agt cat caa gca aaa ctg act cca Val Ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro 1 5 10 15		48
10	gta ctg aga agt aaa tct cag ttt aag ggg ctt ttc att gct att gtc Val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile Val 20 25 30		96
15	att gtt agc gca tgg gtc att agc ctg agt tta tta ctt tcc ctt gac Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp 35 40 45		144
20	atc tca aag cta aaa ttt tgg atg tta ttg cct gtt ata cta tgg caa Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln 50 55 60		192
25	aca ttt tta tat acg gga tta ttt att aca tct cat gat gcc atg cat Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His 65 70 75 80		240
30	ggc gta gta ttt ccc caa aac acc aag att aat cat ttg att gga aca Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr 85 90 95		288
35	ttg acc cta tcc ctt tat ggt ctt tta cca tat caa aaa cta ttg aaa Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys 100 105 110		336
40	aaa cat tgg tta cac cac cac aat cca gca agc tca ata gac ccg gat Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp 115 120 125		384
45	ttt cac aat ggt aaa cac caa agt ttc ttt gct tgg tat ttt cat ttt Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe 130 135 140		432
50	atg aaa ggt tac tgg agt tgg ggg caa ata att gcg ttg act att att Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile 145 150 155 160		480
55	tat aac ttt gct aaa tac ata ctc cat atc cca agt gat aat cta act Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr 165 170 175		528
60	tac ttt tgg gtg cta ccc tcg ctt tta agt tca tta caa tta ttc tat Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr 180 185 190		576
65	ttt ggt act ttt tta ccc cat agt gaa cca ata ggg ggt tat gtt cag Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln 195 200 205		624
70	cct cat tgt gcc caa aca att agc cgt cct att tgg tgg tca ttt atc Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile 210 215 220		672
75	acg tgc tat cat ttt ggc tac cac gag gaa cat cac gaa tat cct cat Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240		720
80	att tct tgg tgg cag tta cca gaa att tac aaa gca aaa tag Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys 245 250		762

5 <210> 4
5 <211> 253
5 <212> PRT
5 <213> Nostoc sp. PCC73102
10
10 <400> 4
10 val ile Gln Leu Glu Gln Pro Leu Ser His Gln Ala Lys Leu Thr Pro
15 1 5 10 15
15 val Leu Arg Ser Lys Ser Gln Phe Lys Gly Leu Phe Ile Ala Ile val
20 20 25 30
20 Ile Val Ser Ala Trp Val Ile Ser Leu Ser Leu Leu Ser Leu Asp
25 35 40 45
25 Ile Ser Lys Leu Lys Phe Trp Met Leu Leu Pro Val Ile Leu Trp Gln
30 50 55 60
30 Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Ser His Asp Ala Met His
35 65 70 75 80
35 Gly Val Val Phe Pro Gln Asn Thr Lys Ile Asn His Leu Ile Gly Thr
40 85 90 95
40 Leu Thr Leu Ser Leu Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Gln Lys Leu Leu Lys
45 100 105 110
45 Lys His Trp Leu His His Asn Pro Ala Ser Ser Ile Asp Pro Asp
50 115 120 125
50 Phe His Asn Gly Lys His Gln Ser Phe Phe Ala Trp Tyr Phe His Phe
55 130 135 140
55 Met Lys Gly Tyr Trp Ser Trp Gly Gln Ile Ile Ala Leu Thr Ile Ile
60 145 150 155 160
60 Tyr Asn Phe Ala Lys Tyr Ile Leu His Ile Pro Ser Asp Asn Leu Thr
65 165 170 175
65 Tyr Phe Trp Val Leu Pro Ser Leu Leu Ser Ser Leu Gln Leu Phe Tyr
70 180 185 190
70 Phe Gly Thr Phe Leu Pro His Ser Glu Pro Ile Gly Gly Tyr Val Gln
75 195 200 205
75 Pro His Cys Ala Gln Thr Ile Ser Arg Pro Ile Trp Trp Ser Phe Ile
80 210 215 220

5	Thr Cys Tyr His Phe Gly Tyr His Glu Glu His His Glu Tyr Pro His 225 230 235 240	
	Ile Ser Trp Trp Gln Leu Pro Glu Ile Tyr Lys Ala Lys 245 250	
10	<210> 5	
	<211> 1608	
15	<212> DNA	
	<213> Haematococcus pluvialis	
20	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (3)..(971)	
	<223>	
30	<400> 5	
	ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile 1 5 10 15	47
35	ggc cca cct cct cat ctc cat cggt tca ttt gct gct acc acg atg ctg Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu 20 25 30	95
40	tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala 35 40 45	143
45	cgc gac atc acg cggt ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser 50 55 60	191
50	tta gtt cggt ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly 65 70 75	239
	acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala 80 85 90 95	287
55	ctc cag cag ctt gac cggt gct atc gca gag cgt cgt gcc cgg cgc aaa Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys 100 105 110	335
60	cgg gag cag ctg tca tac cag gct gcc gcc att gca gca tca att ggc Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly 115 120 125	383
65	gtg tca ggc att gcc atc ttc gcc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His 130 135 140	431

7/15

	atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu 145 150 155	479
5	ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cgc tat Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr 160 165 170 175	527
10	gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His 180 185 190	575
15	aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac ttg Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu 195 200 205	623
20	ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly 210 215 220 225	671
25	tcc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu 225 230 235	719
30	ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu 240 245 250	767
35	gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met 260 265 270	815
40	aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly 275 280 285	863
45	gac gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile 290 295 300	911
50	cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp 305 310 315	959
55	tcc aag cgg tag ggtgcggAAC caggcacgCT ggtttcacAC ctcatgcctG Ser Lys Arg 320	1011
60	tgataaggtg tggctagAGC gatgcgtgtg agacgggtat gtcacggTCg actggTctGA tggccaatGG catcgGCCat gTCTGGTcat cacGGGCTGG ttGcCTGGGT gaaggGTatG cacatcatCA tGTGCGGTTG gagGGGCTGG cacagtGTGG gCTGAactGG agcAGTTGTC catattCTAT ttGTGGGAGC tgAGATGATG gCATGCTTG gATGTGcatG gATCATGGTA gtGcAGCAA CTATATTcAC CTAGGGCTGT TGGTAGGATC agGTGAGGCC ttGcACATTG catGATGTAC TCGTcatGGT GTGTTGGTGA gaggATGGAT GTGGATGGAT GTGTATTCTC agacGTagAC CTTGACTGGA ggCTTgATCG agAGAGTGGG CCgtATTCTT TGAGAGGGGA 65 ggCTCGTGCc AGAAATGGTG AGTGGATGAC TGTGACGCTG tacATTGcAG GCAGGtGAGA TGCACTGTCT CGATTGtaAA ATACATTcAG ATGCAaaaaAA AAAAaaaaAA 1608	1071 1131 1191 1251 1311 1371 1431 1491 1551

10 <210> 6
5 <211> 322
 <212> PRT
10 <213> *Haematococcus pluvialis*

15 <400> 6
15 Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly
1 5 10 15
20 Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser
20 20 25 30
25 Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg
25 35 40 45
30 Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu
30 50 55 60
35 Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr
35 65 70 75 80
40 Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg
40 100 105 110
45 Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val
45 115 120 125
50 Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met
50 130 135 140
55 Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu
55 145 150 155 160
60 Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala
60 165 170 175
65 His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys
65 180 185 190
70 Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe
70 195 200 205
75 Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe

9/15

	210	215	220	
5	Trp Leu Pro Asn Val	Leu Gly Ala Ala Cys	Phe Gly Ala Gly Leu Gly	
	225 230	235	240	
10	Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met	Phe Val His Asp Gly Leu Val		
	245	250	255	
	His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro	Tyr Met Lys		
	260	265	270	
15	Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys	Tyr Gly Gly		
	275	280	285	
20	Ala Pro Trp Gly Met Phe	Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro		
	290	295	300	
25	Gly Ala Ala Glu Glu Val	Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser		
	305	310	315	320
	Lys Arg			
30	<210> 7			
35	<211> 1650			
	<212> DNA			
	<213> Lycopersicon esculentum			
40	<220>			
45	<221> CDS			
	<222> (112)..(1614)			
	<223>			
50	<400> 7			
	ggcacgagga aactttctc tcttactag ctgttacat gcttcaaatt tcaagatttt			60
55	aggaccccat ttgaagtttt cttgaaacaa atattaccct gttggaaaaa g atg gat			
		Met Asp		117
60	act ttg ttg aaa acc cca aat aac ctt gaa ttt ctg aac cca cat cat			
	Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro His His			
	5 10 15			
65	ggt ttt gct gtt aaa gct agt acc ttt aga tct gag aag cat cat aat			213
	Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His His Asn			
	20 25 30			
	ttt ggt tct agg aag ttt tgt gaa act ttg ggt aga agt gtt tgt gtt			261

	Phe	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Cys	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Ser	Val	Cys	Val	
	35					40					45					50	
5	aag	ggt	agt	agt	agt	gct	ctt	tta	gag	ctt	gta	cct	gag	acc	aaa	aag	309
	Lys	Gly	Ser	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Lys	
						55				60					65		
10	gag	aat	ctt	gat	ttt	gag	ctt	cct	atg	tat	gac	cct	tca	aaa	ggg	gtt	357
	Glu	Asn	Leu	Asp	Phe	Glu	Leu	Pro	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Lys	Gly	Val	
						70			75				80				
15	gtt	gtg	gat	ctt	gct	gtg	gtt	ggt	ggt	ggc	cct	gca	gga	ctt	gct	gtt	405
	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	
						85			90				95				
20	gca	cag	caa	gtt	tct	gaa	gca	gga	ctc	tct	gtt	tgt	tca	att	gat	ccg	453
	Ala	Gln	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Cys	Ser	Ile	Asp	Pro	
						100			105			110					
25	aat	cct	aaa	ttg	ata	tgg	cct	aat	aac	tat	ggt	gtt	tgg	gtg	gat	gaa	501
	Asn	Pro	Lys	Leu	Ile	Trp	Pro	Asn	Asn	Tyr	Gly	Val	Trp	Val	Asp	Glu	
						115			120			125				130	
30	ttt	gag	gct	atg	gac	ttg	tta	gat	tgt	cta	gat	gct	acc	tgg	tct	ggt	549
	Phe	Glu	Ala	Met	Asp	Leu	Leu	Asp	Cys	Leu	Asp	Ala	Thr	Trp	Ser	Gly	
						135			140				145				
35	gca	gca	gtg	tac	att	gat	gat	aat	acg	gct	aaa	gat	ctt	cat	aga	cct	597
	Ala	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Asp	Asn	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	His	Arg	Pro	
						150			155				160				
40	tat	gga	agg	gtt	aac	cg	aaa	cag	ctg	aaa	tcg	aaa	atg	atg	cag	aaa	645
	Tyr	Gly	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Gln	Leu	Lys	Ser	Lys	Met	Met	Gln	Lys	
						165			170				175				
45	tgt	ata	atg	aat	ggt	gtt	aaa	tcc	cac	caa	gcc	aaa	gtt	ata	aag	gtg	693
	Cys	Ile	Met	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	His	Gln	Ala	Lys	Val	Ile	Lys	Val	
						180			185			190					
50	att	cat	gag	gaa	tcg	aaa	tcc	atg	ttg	ata	tgc	aat	gat	ggt	att	act	741
	Ile	His	Glu	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Leu	Ile	Cys	Asn	Asp	Gly	Ile	Thr	
						195			200			205				210	
55	att	cag	gca	acg	gtg	gtg	ctc	gat	gca	act	ggc	tcc	tct	aga	tct	ctt	789
	Ile	Gln	Ala	Thr	Val	Val	Leu	Asp	Ala	Thr	Gly	Phe	Ser	Arg	Ser	Leu	
						215			220				225				
60	gtt	cag	tat	gat	aag	cct	tat	aac	ccc	ggg	tat	caa	gtt	gct	tat	ggc	837
	Val	Gln	Tyr	Asp	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Tyr	Gln	Val	Ala	Tyr	Gly	
						230			235				240				
65	att	ttg	gct	gaa	gtg	gaa	gag	cac	ccc	ttt	gat	gta	aac	aag	atg	gtt	885
	Ile	Leu	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Val	Asn	Lys	Met	Val	
						245			250				255				
70	ttc	atg	gat	tgg	cga	gat	tct	cat	ttg	aag	aac	aat	act	gat	ctc	aag	933
	Phe	Met	Asp	Trp	Arg	Asp	Ser	His	Leu	Lys	Asn	Asn	Thr	Asp	Leu	Lys	
						260			265			270					
75	gag	aga	aat	agt	aga	ata	cca	act	ttt	ctt	tat	gca	atg	cca	ttt	tca	981
	Glu	Arg	Asn	Ser	Arg	Ile	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ala	Met	Pro	Phe	Ser	
						275			280			285				290	
80	tcc	aac	agg	ata	ttt	ctt	gaa	gaa	aca	tca	ctc	gta	gct	cgt	cct	ggc	1029
	Ser	Asn	Arg	Ile	Phe	Leu	Glu	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Ala	Arg	Pro	Gly	
						295			300				305				

11/15

	ttg cgt ata gat gat att caa gaa cga atg gtg gct cgt tta aac cat Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu Asn His 310 315 320	1077
5	ttg ggg ata aaa gtg aag agc att gaa gaa gat gaa cat tgt cta ata Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys Leu Ile 325 330 335	1125
10	cca atg ggt ggt cca ctt cca gta tta cct cag aga gtc gtt gga atc Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val Gly Ile 340 345 350	1173
15	ggt ggt aca gct ggc atg gtt cat cca tcc acc ggt tat atg gtg gca Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met Val Ala 355 360 365 370	1221
20	agg aca cta gct gcg gct cct gtt gtt gcc aat gcc ata att caa tac Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile Gln Tyr 375 380 385	1269
25	ctc ggt tct gaa aga agt cat tcg ggt aat gaa tta tcc aca gct gtt Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr Ala Val 390 395 400	1317
30	tgg aaa gat ttg tgg cct ata gag agg aga cgt caa aga gag ttc ttc Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu Phe Phe 405 410 415	1365
35	tgc ttc ggt atg gat att ctt ctg aag ctt gat tta cct gct aca aga Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala Thr Arg 420 425 430	1413
40	agg ttc ttt gat gca ttc ttt gac tta gaa cct cgt tat tgg cat ggc Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp His Gly 435 440 445 450	1461
45	ttc tta tcg tct cga ttg ttt cta cct gaa ctc ata gtt ttt ggg ctg Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe Gly Leu 455 460 465	1509
50	tct cta ttc tct cat gct tca aat act tct aga ttt gag ata atg aca Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile Met Thr 470 475 480	1557
55	aag gga act gtt cca tta gta aat atg atc aac aat ttg tta cag gat Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu Gln Asp 485 490 495	1605
60	aaa gaa tga atccgagtaa ttccggaatct tgtccaatct cgtgcc Lys Glu 500	1650
65	<210> 8 <211> 500 <212> PRT <213> Lycopersicon esculentum <400> 8 Met Asp Thr Leu Leu Lys Thr Pro Asn Asn Leu Glu Phe Leu Asn Pro 1 5 10 15	

His His Gly Phe Ala Val Lys Ala Ser Thr Phe Arg Ser Glu Lys His
20 25 30

5 His Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Cys Glu Thr Leu Gly Arg Ser Val
35 40 45

10 Cys Val Lys Gly Ser Ser Ser Ala Leu Leu Glu Leu Val Pro Glu Thr
50 55 60

15 Lys Lys Glu Asn Leu Asp Phe Glu Leu Pro Met Tyr Asp Pro Ser Lys
65 70 75 80

20 Gly Val Val Val Asp Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Leu
85 90 95

25 Ala Val Ala Gln Gln Val Ser Glu Ala Gly Leu Ser Val Cys Ser Ile
100 105 110

Asp Pro Asn Pro Lys Leu Ile Trp Pro Asn Asn Tyr Gly Val Trp Val
115 120 125

30 Asp Glu Phe Glu Ala Met Asp Leu Leu Asp Cys Leu Asp Ala Thr Trp
130 135 140

35 Ser Gly Ala Ala Val Tyr Ile Asp Asp Asn Thr Ala Lys Asp Leu His
145 150 155 160

40 Arg Pro Tyr Gly Arg Val Asn Arg Lys Gln Leu Lys Ser Lys Met Met
165 170 175

45 Gln Lys Cys Ile Met Asn Gly Val Lys Phe His Gln Ala Lys Val Ile
180 185 190

Lys Val Ile His Glu Glu Ser Lys Ser Met Leu Ile Cys Asn Asp Gly
195 200 205

50 Ile Thr Ile Gln Ala Thr Val Val Leu Asp Ala Thr Gly Phe Ser Arg
210 215 220

55 Ser Leu Val Gln Tyr Asp Lys Pro Tyr Asn Pro Gly Tyr Gln Val Ala
225 230 235 240

60 Tyr Gly Ile Leu Ala Glu Val Glu Glu His Pro Phe Asp Val Asn Lys
245 250 255

65 Met Val Phe Met Asp Trp Arg Asp Ser His Leu Lys Asn Asn Thr Asp
260 265 270

Leu Lys Glu Arg Asn Ser Arg Ile Pro Thr Phe Leu Tyr Ala Met Pro

13/15

	275	280	285
5	Phe Ser Ser Asn Arg Ile Phe Leu Glu Glu Thr Ser Leu Val Ala Arg 290 295 300		
10	Pro Gly Leu Arg Ile Asp Asp Ile Gln Glu Arg Met Val Ala Arg Leu 305 310 315 320		
15	Asn His Leu Gly Ile Lys Val Lys Ser Ile Glu Glu Asp Glu His Cys 325 330 335		
20	Leu Ile Pro Met Gly Gly Pro Leu Pro Val Leu Pro Gln Arg Val Val 340 345 350		
25	Gly Ile Gly Gly Thr Ala Gly Met Val His Pro Ser Thr Gly Tyr Met 355 360 365		
30	Val Ala Arg Thr Leu Ala Ala Ala Pro Val Val Ala Asn Ala Ile Ile 370 375 380		
35	Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Arg Ser His Ser Gly Asn Glu Leu Ser Thr 385 390 395 400		
40	Ala Val Trp Lys Asp Leu Trp Pro Ile Glu Arg Arg Arg Gln Arg Glu 405 410 415		
45	Phe Phe Cys Phe Gly Met Asp Ile Leu Leu Lys Leu Asp Leu Pro Ala 420 425 430		
50	Thr Arg Arg Phe Phe Asp Ala Phe Phe Asp Leu Glu Pro Arg Tyr Trp 435 440 445		
55	His Gly Phe Leu Ser Ser Arg Leu Phe Leu Pro Glu Leu Ile Val Phe 450 455 460		
60	Gly Leu Ser Leu Phe Ser His Ala Ser Asn Thr Ser Arg Phe Glu Ile 465 470 475 480		
65	Met Thr Lys Gly Thr Val Pro Leu Val Asn Met Ile Asn Asn Leu Leu 485 490 495		
	Gln Asp Lys Glu 500		
60	<210> 9		
	<211> 22		
	<212> DNA		
65	<213> künstliche Sequenz		

5 <221> Primer
<222> (1)..(22)
<223> 148-Start

10
15 <400> 9
atgatccagt tagaacaacc ac 22

20 <210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

25
30 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(24)
<223> 148-End

35 <400> 10
ctattttgct ttgtaaaattt ctgg 24

40 <210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

45
50 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223> 38-Start

55
60 <400> 11
atgaattttt gtgataaaacc agttag 26

65 <210> 12

15 <211> 23

10 <212> DNA

5 <213> künstliche Sequenz

10 <220>

15 <221> Primer

<222> (1)..(23)

15 <223> 38-End

20 <400> 12
acgaatttgt tactgaattg ttg

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	IPC 7 C12N9/00	C12N9/02	C12P23/00	C12N5/04
-------------------------------------	----------------	----------	-----------	----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 735 137 A (KIRIN BREWERY ;MARINE BIOTECH INST CO LTD (JP)) 2 October 1996 (1996-10-02) cited in the application the whole document ---	1-43
Y	WO 99/07867 A (CALGENE LLC) 18 February 1999 (1999-02-18) the whole document ---	1-43
Y	WO 99/61652 A (UNIV MARYLAND ;CUNNINGHAM FRANCIS X (US)) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document ---	1-43
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

13 May 2004

Date of mailing of the International search report

23/06/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vogt, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14876

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MEEKS JOHN C ET AL: "An overview of the genome of <i>Nostoc punctiforme</i> , a multicellular, symbiotic cyanobacterium" PHOTOSYNTHESIS RESEARCH, vol. 70, no. 1, 2001, pages 85-106, XP002280191 ISSN: 0166-8595 the whole document ---	1-43
P,X	WO 03/012056 A (CHENG QIONG ;DU PONT (US); TAO LUAN (US)) 13 February 2003 (2003-02-13) the whole document ---	1-43
P,X	WO 03/080849 A (BALL HORTICULTURAL COMPANY) 2 October 2003 (2003-10-02) the whole document ---	1-43
E	WO 2004/018693 A (KLEBSATTEL MARTIN ;HERBERS KARIN (DE); KUNZE IRENE (DE); FLACHMANN) 4 March 2004 (2004-03-04) page E ---	1-43
E	WO 2004/018694 A (KLEBSATTEL MARTIN ;FLACHMANN RALF (DE); SAUER MATT (DE); SCHOPFER) 4 March 2004 (2004-03-04) the whole document ---	1-43
E	DE 102 38 978 A (SUNGENE GMBH & CO KGAA) 4 March 2004 (2004-03-04) the whole document ---	1-43
A	KANEKO T ET AL: "Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium <i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, vol. 8, no. 5, 31 October 2001 (2001-10-31), pages 205-213, XP002262221 ISSN: 1340-2838 the whole document ---	
X	& DATABASE EMBL 'Online! Accession No: Q8YSA0, 1 March 2002 (2002-03-01) 55.8% identity to SEQ ID NO: 2 59.0% identity to SEQ ID NO: 4 abstract ---	39,40
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14876

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	MOFFITT MICHELLE C ET AL: "Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations." JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION. UNITED STATES APR 2003, vol. 56, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 446-457, XP001181370 ISSN: 0022-2844 the whole document & DATABASE EMBL 'Online!' Accesion No: Q847D1, 1 June 2003 (2003-06-01) 61.9% identity to SEQ ID NO: 2 78.9% identity to SEQ ID NO: 4 abstract ---	
P,X		39,40
A	MISAWA N ET AL: "Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 59, no. 3, 3 January 1998 (1998-01-03), pages 169-181, XP004113748 ISSN: 0168-1656 ---	
A	LEE P C ET AL: "Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 60, no. 1-2, October 2002 (2002-10), pages 1-11, XP002280186 ISSN: 0175-7598 the whole document ---	
A	SIEIRO C ET AL: "Genetic basis of microbial carotenogenesis." INTERNATIONAL MICROBIOLOGY: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SPANISH SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. SPAIN MAR 2003, vol. 6, no. 1, March 2003 (2003-03), pages 11-16, XP009030878 ISSN: 1139-6709 the whole document ---	-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/14876

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MISAWA N ET AL: "STRUCTURE AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A MARINE BACTERIAL CAROTENOID BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER AND ASTAXANTHIN BIOSYNTHETIC PATHWAY PROPOSED AT THE GENE LEVEL" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 177, no. 22, 1 November 1995 (1995-11-01), pages 6575-6584, XP000196417 ISSN: 0021-9193 cited in the application the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/14876

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0735137	A	02-10-1996		AU 702584 B2 AU 1281195 A CA 2180024 A1 EP 0735137 A1 FI 962633 A JP 3375639 B2 KR 231454 B1 NO 962689 A US 5811273 A EP 1203818 A2 WO 9518220 A1 US 5972690 A US 6150130 A		25-02-1999 17-07-1995 06-07-1995 02-10-1996 23-08-1996 10-02-2003 01-12-1999 27-08-1996 22-09-1998 08-05-2002 06-07-1995 26-10-1999 21-11-2000
WO 9907867	A	18-02-1999		US 6429356 B1 AU 747542 B2 AU 8900298 A CA 2299631 A1 CN 1275166 T EP 1002117 A1 JP 2001512688 T US 2002092039 A1 WO 9907867 A1		06-08-2002 16-05-2002 01-03-1999 18-02-1999 29-11-2000 24-05-2000 28-08-2001 11-07-2002 18-02-1999
WO 9961652	A	02-12-1999		AU 4184699 A BR 9917159 A CA 2333281 A1 EP 1185682 A1 JP 2002516117 T WO 9961652 A1 US 6551807 B1		13-12-1999 17-12-2002 02-12-1999 13-03-2002 04-06-2002 02-12-1999 22-04-2003
WO 03012056	A	13-02-2003		CA 2451142 A1 WO 03012056 A2 US 2003100045 A1		13-02-2003 13-02-2003 29-05-2003
WO 03080849	A	02-10-2003		US 2003196232 A1 US 2004003430 A1 WO 03080849 A2 WO 2004002214 A2 US 2004010826 A1 US 2004022881 A1		16-10-2003 01-01-2004 02-10-2003 08-01-2004 15-01-2004 05-02-2004
WO 2004018693	A	04-03-2004		DE 10238980 A1 DE 10238978 A1 DE 10238979 A1 WO 2004018688 A1 WO 2004018693 A2 WO 2004018385 A2 WO 2004018694 A2 WO 2004018695 A2 WO 2004017749 A2 WO 2004022765 A2 WO 2004027069 A1		04-03-2004 04-03-2004 26-02-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 18-03-2004 01-04-2004
WO 2004018694	A	04-03-2004		DE 10238980 A1 DE 10238978 A1 DE 10238979 A1		04-03-2004 04-03-2004 26-02-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/14876

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2004018694 A		WO	2004018688 A1	04-03-2004
		WO	2004018693 A2	04-03-2004
		WO	2004018385 A2	04-03-2004
		WO	2004018694 A2	04-03-2004
		WO	2004018695 A2	04-03-2004
		WO	2004017749 A2	04-03-2004
		WO	2004022765 A2	18-03-2004
		WO	2004027069 A1	01-04-2004
DE 10238978 A	04-03-2004	DE	10238978 A1	04-03-2004
		WO	2004018693 A2	04-03-2004
		WO	2004018385 A2	04-03-2004
		WO	2004018694 A2	04-03-2004
		WO	2004018695 A2	04-03-2004
		WO	2004017749 A2	04-03-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14876

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	C12N9/00	C12N9/02	C12P23/00	C12N5/04
-------	----------	----------	-----------	----------

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P C07C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 735 137 A (KIRIN BREWERY ;MARINE BIOTECH INST CO LTD (JP)) 2. Oktober 1996 (1996-10-02) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-43
Y	WO 99/07867 A (CALGENE LLC) 18. Februar 1999 (1999-02-18) das ganze Dokument ---	1-43
Y	WO 99/61652 A (UNIV MARYLAND ;CUNNINGHAM FRANCIS X (US)) 2. Dezember 1999 (1999-12-02) das ganze Dokument ---	1-43
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch das das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

V Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

13. Mai 2004

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

23/06/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Vogt, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14876

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	MEEKS JOHN C ET AL: "An overview of the genome of <i>Nostoc punctiforme</i> , a multicellular, symbiotic cyanobacterium" PHOTOSYNTHESIS RESEARCH, Bd. 70, Nr. 1, 2001, Seiten 85-106, XP002280191 ISSN: 0166-8595 das ganze Dokument ---	1-43
P,X	WO 03/012056 A (CHENG QIONG ;DU PONT (US); TAO LUAN (US)) 13. Februar 2003 (2003-02-13) das ganze Dokument ---	1-43
P,X	WO 03/080849 A (BALL HORTICULTURAL COMPANY) 2. Oktober 2003 (2003-10-02) das ganze Dokument ---	1-43
E	WO 2004/018693 A (KLEBSATTEL MARTIN ;HERBERS KARIN (DE); KUNZE IRENE (DE); FLACHMANN) 4. März 2004 (2004-03-04) Seite E ---	1-43
E	WO 2004/018694 A (KLEBSATTEL MARTIN ;FLACHMANN RALF (DE); SAUER MATT (DE); SCHOPFER) 4. März 2004 (2004-03-04) das ganze Dokument ---	1-43
E	DE 102 38 978 A (SUNGENE GMBH & CO KGAA) 4. März 2004 (2004-03-04) das ganze Dokument ---	1-43
A	KANEKO T ET AL: "Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium <i>Anabaena</i> sp. strain PCC 7120" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, Bd. 8, Nr. 5, 31. Oktober 2001 (2001-10-31), Seiten 205-213, XP002262221 ISSN: 1340-2838 das ganze Dokument & DATABASE EMBL 'Online! Accession No: Q8YSA0, 1. März 2002 (2002-03-01) 55.8% identity to SEQ ID NO: 2 59.0% identity to SEQ ID NO: 4 Zusammenfassung ---	39,40
X		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14876

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	MOFFITT MICHELLE C ET AL: "Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations." JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION. UNITED STATES APR 2003, Bd. 56, Nr. 4, April 2003 (2003-04), Seiten 446-457, XP001181370 ISSN: 0022-2844 das ganze Dokument	
P,X	& DATABASE EMBL 'Online! Accession No: Q847D1, 1. Juni 2003 (2003-06-01) 61.9% identity to SEQ ID NO: 2 78.9% identity to SEQ ID NO: 4 Zusammenfassung ----	39,40
A	MISAWA N ET AL: "Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 59, Nr. 3, 3. Januar 1998 (1998-01-03), Seiten 169-181, XP004113748 ISSN: 0168-1656 ----	
A	LEE P C ET AL: "Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms." APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 60, Nr. 1-2, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 1-11, XP002280186 ISSN: 0175-7598 das ganze Dokument ----	
A	SIEIRO C ET AL: "Genetic basis of microbial carotenogenesis." INTERNATIONAL MICROBIOLOGY: THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SPANISH SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. SPAIN MAR 2003, Bd. 6, Nr. 1, März 2003 (2003-03), Seiten 11-16, XP009030878 ISSN: 1139-6709 das ganze Dokument ----	-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14876

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MISAWA N ET AL: "STRUCTURE AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF A MARINE BACTERIAL CAROTENOID BIOSYNTHESIS GENE CLUSTER AND ASTAXANTHIN BIOSYNTHETIC PATHWAY PROPOSED AT THE GENE LEVEL" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 177, Nr. 22, 1. November 1995 (1995-11-01), Seiten 6575-6584, XP000196417 ISSN: 0021-9193 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14876

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0735137	A	02-10-1996	AU CA EP FI JP KR NO US EP WO US US	702584 B2 1281195 A 2180024 A1 0735137 A1 962633 A 3375639 B2 231454 B1 962689 A 5811273 A 1203818 A2 9518220 A1 5972690 A 6150130 A	B2 A1 A1 A A2 A1 A A A A A A A A	25-02-1999 17-07-1995 06-07-1995 02-10-1996 23-08-1996 10-02-2003 01-12-1999 27-08-1996 22-09-1998 08-05-2002 06-07-1995 26-10-1999 21-11-2000
WO 9907867	A	18-02-1999	US AU AU CA CN EP JP US WO	6429356 B1 747542 B2 8900298 A 2299631 A1 1275166 T 1002117 A1 2001512688 T 2002092039 A1 9907867 A1	B1 B2 A A1 T A1 T A1	06-08-2002 16-05-2002 01-03-1999 18-02-1999 29-11-2000 24-05-2000 28-08-2001 11-07-2002 18-02-1999
WO 9961652	A	02-12-1999	AU BR CA EP JP WO US	4184699 A 9917159 A 2333281 A1 1185682 A1 2002516117 T 9961652 A1 6551807 B1	A A1 A1 A1 T A1 B1	13-12-1999 17-12-2002 02-12-1999 13-03-2002 04-06-2002 02-12-1999 22-04-2003
WO 03012056	A	13-02-2003	CA WO US	2451142 A1 03012056 A2 2003100045 A1	A1 A2 A1	13-02-2003 13-02-2003 29-05-2003
WO 03080849	A	02-10-2003	US WO WO WO WO	2003196232 A1 2004003430 A1 03080849 A2 2004002214 A2 2004010826 A1 2004022881 A1	A1 A1 A2 A2 A1 A1	16-10-2003 01-01-2004 02-10-2003 08-01-2004 15-01-2004 05-02-2004
WO 2004018693	A	04-03-2004	DE DE DE WO WO WO WO WO WO WO	10238980 A1 10238978 A1 10238979 A1 2004018688 A1 2004018693 A2 2004018385 A2 2004018694 A2 2004018695 A2 2004017749 A2 2004022765 A2 2004027069 A1	A1 A1 A1 A1 A2 A2 A2 A2 A2 A2 A1	04-03-2004 04-03-2004 26-02-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 18-03-2004 01-04-2004
WO 2004018694	A	04-03-2004	DE DE DE	10238980 A1 10238978 A1 10238979 A1	A1 A1 A1	04-03-2004 04-03-2004 26-02-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/14876

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004018694 A		WO 2004018688 A1 WO 2004018693 A2 WO 2004018385 A2 WO 2004018694 A2 WO 2004018695 A2 WO 2004017749 A2 WO 2004022765 A2 WO 2004027069 A1	04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 18-03-2004 01-04-2004
DE 10238978 A	04-03-2004	DE 10238978 A1 WO 2004018693 A2 WO 2004018385 A2 WO 2004018694 A2 WO 2004018695 A2 WO 2004017749 A2	04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004 04-03-2004